



TITLE:

内在性ドパミンおよびドパミン受容体アゴニストによる選択的ドパミンニューロン死制御機構に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

泉, 安彦

CITATION:

泉, 安彦. 内在性ドパミンおよびドパミン受容体アゴニストによる選択的ドパミンニューロン死制御機構に関する研究. 京都大学, 2007, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2007-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k12982>

RIGHT:

内在性ドパミンおよびドパミン受容体アゴニストによる
選択的ドパミンニューロン死制御機構に関する研究

2006

泉 安彦

内在性ドパミンおよびドパミン受容体アゴニストによる
選択的ドパミンニューロン死制御機構に関する研究

2006

泉 安彦

目次

緒言	1
第一章 選択的ドパミンニューロン死に対する内在性ドパミンの関与	3
実験方法	4
実験結果	8
第一節 ロテノン誘発ドパミンニューロン選択毒性の発現機序	8
第二節 パラコート誘発細胞死における内在性ドパミンの役割	11
第三節 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死の機序	16
考察	23
第二章 ドパミン誘発細胞死におけるドパミン酸化中間体の役割	28
実験方法	28
実験結果	30
第一節 ドパミン誘発細胞死に関与する因子	30
第二節 ドパミン自動酸化およびドパミン毒性に対する鉄イオンの作用	32
考察	34
第三章 プラミペキソールによるグルタミン酸神経毒性に対する保護作用機序	36
実験方法	36
実験結果	39
第一節 プラミペキソールのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用	39
第二節 ドパミンアゴニストの内在性ドパミンに対する作用	43
考察	49
総括および結論	52
謝辞	53
発表論文目録	54
引用文献	55

緒 言

高齢化社会を迎えた結果、脳神経疾患に罹患する割合が急速に高くなり、予防と治療に対する社会的な要請が一段と強まりつつある。中でも、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症などの難治性神経変性疾患は原因が不明であり、根本的な解決法は未だ得られていない。これらの疾患では特定の脳部位において神経細胞が変性・脱落しており、神経細胞死の分子機構解明は疾患の克服に有用であると考えられる。

パーキンソン病は、アルツハイマー病について罹患人口(10万人に約100人)が多い神経変性疾患である。病理学的には、中脳黒質緻密部のドパミンニューロンが変性・脱落することを特徴とする。その結果、投射先である線条体のドパミン量が減少し、筋固縮・無動・震戦・姿勢反射障害を主症状とする錐体外路障害を呈する。発病の原因として、遺伝的素因と環境因子との両方が指摘されている。パーキンソン病の9割以上が孤発例であることや双子を比較した研究などから遺伝的素因のみの役割は小さいと考えられており、環境因子の関与に強く関心が持たれている。疫学調査により農薬の曝露がパーキンソン病のリスクを増大させることが示唆されており、実験的にも殺虫剤や除草剤の全身投与が黒質ドパミンニューロンを選択的に変性させることが報告されている。しかし、農薬に対して黒質ドパミンニューロンが特に脆弱である理由は不明である。

パーキンソン病の症状およびドパミンニューロンの脱落は慢性的で進行性の経過を辿るため、発症だけでなく進行期の病態機序解明もまた重要である。黒質ドパミンニューロンの脱落による線条体ドパミン量の減少は、視床下核のグルタミン酸作動性神経を興奮させると推定されている。グルタミン酸は、神経系では興奮性神経伝達物質として機能するが、過剰に遊離されると神経細胞死を誘発する内因性興奮毒として働く。視床下核のグルタミン酸作動性神経の一部は中脳黒質に投射していることから、パーキンソン病進行期のドパミンニューロン死にグルタミン酸が関与することが示唆されている。しかし、グルタミン酸受容体の活性化が選択的なドパミンニューロン変性を惹起する機序については明らかにされていない。

パーキンソン病は錐体外路障害以外に起立性低血圧、便秘、流涎、排尿障害などの自律神経症状を併発することがある。また、進行した場合、ノルアドレナリン作動性(青斑核)、セロトニン作動性(縫線核)のニューロンにも病変部位が及ぶことが知られている。これらの知見より、パーキンソン病ではカテコラミン作動性神経全般で障害が生じている可能性がある。カテコラミン作動性神経に含有される神経伝達物質カテコラミンは反応性が高く細胞毒性を生じることが指摘されており、カテコラミン作動性神経の脆弱性に内在性カテコラミンの関与が疑われる。

パーキンソン病治療は、ドパミン前駆物質であるレボドパによるドパミン補充療法が中心となっている。しかし、レボドパの長期投与は薬効の持続時間が短くなるwearing-off現象、症状の著明な日内変動を起こすon-off現象、不随意運動(ジスキネジア)などの問題症状を生じるため、最近のパーキンソン病治療ガイドラインでは、ドパミンアゴニストで治療を開始し、レボドパの使用をできるだけ遅らせるよう推奨されている。ドパミンアゴニストはレボドパの代替となるだけでなく、基礎実験系で認められた神経保護作用が臨床的にも期待されている。海外での臨床研究において、近年上市されたドパミンD₂受容体アゴニストであるプラミベキソールで治療を開始した群の方が、レボドパで治療を開始した群に比べ、ドパミン作動性神経機能低下が緩徐であることが報告されている。プラミベキソールは*in vitro*および*in vivo*の実験系で神経保護作用を示すが、その詳細な機序については結論に至っていない。さらに、進行期のドパミンニューロン死への関与が指摘されているグルタミン酸神経毒性に対する検討は行われていない。

そこで本研究において、著者は、選択的ドパミンニューロン死における内在性ドパミンの関与およびドパミンD₂受容体アゴニストの神経保護作用機序について研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

- (1) ロテノン、パラコートおよびグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死は細胞内ドパミン枯渇下において抑制され、ドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが寄与することを見出した。

- (2) ドパミン誘発細胞毒性には、自動酸化の過程で生成するドパミン酸化中間体が中心的な役割を担うことを明らかにした。
- (3) プラミペキソールは、ドパミン含有量を減少させることにより、グルタミン酸神経毒性に対する保護作用を発現することを見出した。

これらの研究成果について以下に三章に分けて論述する。

なお、本文中および図中で使用した略号は以下の通りである。

α-MT; α-methyl-DL- <i>p</i> -tyrosine methyl ester	MAO; monoamine oxidase
β-CIT; [¹²³ I]2β-carboxymethoxy-3β-(4-iodophenyl) tropan	MAP2; microtubule-associated protein 2
AACOCF ₃ ; arachidonyl trifluoromethyl ketone	MAPK; mitogen-activated protein kinase
ALDH; aldehyde dehydrogenase	Mn-TBAP; Mn(III)-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin
AM; acetoxymethyl ester	MPP ⁺ ; 1-methyl-4-phenylpyridinium
4-AP; 4-aminopyridine	MPTP; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
ATP; adenosine 5'-triphosphate	MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide
BIM; bisindolylmaleimide	NA; noradrenaline
BRC; <i>R</i> (+)-bromocriptine	NAC; <i>N</i> -acetyl-L-cysteine
BSA; bovine serum albumin	NADPH; β-nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate
Cys; L-cysteine	NBQX; 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]
DA; dopamine	quinoxaline-7-sulfonamide
DAB; 3,3'-diaminobenzidine	NMDA; <i>N</i> -methyl-D-aspartic acid
DAT; dopamine transporter	L-NNA; <i>N</i> ^ω -nitro-L-arginine
DIV; days <i>in vitro</i>	NOS; nitric oxide synthase
DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium	p38; p38 mitogen-activated protein kinase
DMP; domperidone	PBS; phosphate-buffered saline
L-DOPA; L-3,4-dihydroxyphenylalanine	PD; PD98059
DOPAC; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid	PKC; protein kinase C
DOPAL; 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde	PPX; pramipexole
DOPET; 3,4-dihydroxyphenylethanol	PVDF; polyvinylidene difluoride
DPAT; <i>R</i> (+)-7-hydroxy(dipropylamino)tetralin	QNP; (-)-quinpirole
DZP; diazepam	ROS; reactive oxygen species
EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid	SB; SB203580
EGTA; ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid	SCH; SCH23390
EMEM; Eagle's minimum essential medium	SDS; sodium dodecyl sulfate
ERK; extracellular signal-regulated kinase	SKF; SKF38393
FCS; fetal calf serum	SLP; (±)-sulpiride
GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SOD; superoxide dismutase
Glu; glutamate	SP; SP600125
GSH; reduced form of glutathione	SPECT; single-photon emission computed tomography
HRP; horseradish peroxidase	TBS; Tris-buffered saline
HS; horse serum	TEA; tetraethylammonium
HVA; homovanillic acid	TH; tyrosine hydroxylase
i.p.; intraperitoneal injection	Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane
JNK; c-Jun N-terminal kinase	VMAT; vesicular monoamine transporter
LDH; lactate dehydrogenase	XO; xanthine oxidase

第一章

選択的ドパミンニューロン死に対する内在性ドパミンの関与

パーキンソン病は、1817年に英国の医師ジェームス・パーキンソンにより報告されて以来、1912年にLewy小体と呼ばれる封入体の存在が見出され、1960年には黒質ドパミンニューロンが脱落し線条体ドパミン量が減少していることが報告された[1]。1979年に米国カリフォルニア州学生が密造した合成麻薬(メペリジン)の副産物として生じた1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)を摂取し重度のパーキンソニズムを生じたことが報告され[2]、MPTPによるパーキンソン病発症の研究が盛んに行われるようになった。MPTPは脳内に入りアストロサイトのモノアミン酸化酵素(MAO)_Bにより1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)に変換される。MPP⁺が、ドパミントランスポーター(DAT)によりドパミンニューロンに選択的に取り込まれ、ミトコンドリア複合体Iを阻害することで細胞毒性を発揮すると考えられる[3, 4]。パーキンソン病患者では黒質、血小板、骨格筋において複合体I活性の低下が認められることから[5, 6]、ミトコンドリア複合体I活性の低下がパーキンソン病の病態形成に関与することが示唆されている。MPP⁺はパーキンソン病の病態をよく模倣するが自然界に存在しない物質であるため、自然界に存在するMPP⁺類似化合物の探索が行われた。天然系の殺虫剤として使われているロテノンはMPP⁺と同様に、ミトコンドリア複合体Iを阻害する[3, 4]。ロテノンを低濃度長期間全身投与したラットでは、黒質ドパミンニューロンが選択的に変性し、パーキンソン病様症状を呈し、細胞質封入体を形成した[7]。またMPP⁺と構造が類似する化合物として除草剤のパラコートが見出された(図1-1)。台湾においてパーキンソン病の危険因子を調べた疫学研究ではパラコートの曝露が重要な役割を担っていることが指摘され[8]、さらにパラコートを全身投与したマウスでは黒質ドパミンニューロンが選択的に変性することが証明された[9]。ロテノンは脂溶性が高くDATを介さずに細胞内に取り込まれ[10]、パラコートもまたDATに依存せず毒性を発現すること[4]が報告されており、ドパミンニューロンが選択的に傷害された理由としてDATを介するMPP⁺とは異なる機序が推測される。

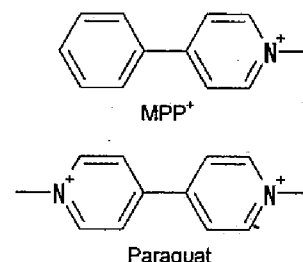


図1-1 MPP⁺とパラコートの化学構造式

黒質ドパミンニューロンの脱落により線条体のドパミン量が低下すると、視床下核が脱抑制され、過剰興奮すると推定されている[11]。中脳黒質にはイオンチャネル型グルタミン酸受容体が発現し[12]、視床下核のグルタミン酸作動性神経の一部は中脳黒質緻密質に投射している[13]。これらを考慮に入れると、パーキンソン病進行期において黒質ドパミンニューロンは、視床下核グルタミン酸作動性神経から持続的なグルタミン酸受容体刺激を受けていることが推測される。グルタミン酸は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たす一方、過剰なグルタミン酸は神経細胞傷害作用を持つ内因性興奮毒となる。したがって、視床下核からの持続性のグルタミン酸受容体刺激はドパミンニューロン死の進行に関与することが示唆される[14]。しかし、ドパミンニューロンがグルタミン酸神経毒性に脆弱であるかどうか、また、どのようにドパミンニューロン死を惹起するかについては明らかにされていない。

最近、パーキンソン病発症早期において、心臓交感神経終末が減少していることが報告された[15]。さらに、著者らのグループは瞳孔交感神経終末も脱落している可能性があることを報告した[16]。これらの知見はパーキンソン病において全身性のカテコラミン作動性神経が障害されていることを示唆している。カテコラミンは生理的条件下において自動酸化を起こし顕著な細胞毒性を生じるため[17]、内在性カテコラミンがカテコラミン作動性神経障害の危険因子として関与していることが想定される。

本章において、著者は、第一節においてロテノン誘発ドパミンニューロン選択毒性の発現機序について、第二節においてパラコート誘発細胞死における内在性ドパミンの役割について、第三節におい

てグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死の機序について検討した。

実験方法

(1) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

ロテノン、パラコート、 α -methyl-DL-*p*-tyrosine methyl ester (α -MT)、パルギリン、ジスルフィラム、2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX)、(+)-dizocilpine (MK-801)、*N*^o-nitro-L-arginine (L-NNA)、bisindolylmaleimide (BIM)、テトラエチルアンモニウム (TEA) およびパキシリンはSigma (St. Louis, MO, USA)より購入した。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)、L-グルタミン酸、レセルピン、グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)、キニジン、4-アミノピリジン(4-AP)および塩化カリウム(KCl)はナカライテスク (Kyoto, Japan)より購入した。*S*(-)-カルビドパ、6-メトキシ-2-ナフトアルデヒド、スタウロスボリン、デシプラミン、arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃)、グリベンクラミドおよびE-4031は和光純薬工業(Osaka, Japan)より購入した。z-VF-CHO (MDL28170)、z-DEVD-fmk、z-VAD-fmk、PD98059およびSB203580はCalbiochem (San Diego, CA, USA)より購入した。GBR12909、SP600125およびAM92016はTocris cookson (Bristol, UK)より購入した。[7,8-³H]標識ドパミンはGE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ, USA)より購入した。Mn(III)-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (Mn-TBAP)はCyaman chemical (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。*p*-チラミンはMP Biomedicals (Irvine, CA, USA)より購入した。EUK-134はBakerらの方法に従い合成した[18]。タクロリムス(FK-506)は藤沢薬品工業(Osaka, Japan)の御厚意により提供していただいた。

(2) 中脳初代分散培養の作製と維持

Wistar系妊娠ラット(確定妊娠16日齢)をペントバルビタール(50 mg/kg i.p.)で麻酔し、37℃に加温した0.1%ヒビテン液に浸し腹部を中心に消毒した。下腹部にイソジン液を塗布した後、常法により子宮を摘出し氷冷ハンクス液(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 3.4 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM K₂HPO₄, 5.6 mM D-glucose, 2.4 mM HEPES, pH 7.2)で洗浄した。以降トリプシン処理までの行程は全て氷冷ハンクス液中で行った。子宮から胎仔を取り出し頭部より全脳を切り出し、前脳および後脳を除去した。得られた中脳を正中線に沿って左右に切り分け、U字の肉厚な中脳腹側部を摘出した。中脳腹側部は氷冷ハンクス液で8回洗浄し、0.1%トリプシン含有ハンクス液に移し、37℃で5分間反応させた。その後、トリプシンの反応を停止するために0.1%トリプシン含有ハンクス液を除去し、40%ウシ胎仔血清(FCS)含有イーグル最少必須培地(EMEM)を加えた。細胞塊をパスツールピペットでピペッティングした後、金属メッシュ(150 mesh/inch)に通し単離細胞懸濁液を得た。200 × g、5分間の遠心を2回繰り返して、得られた細胞のペレットを10%FCS含有EMEMで再懸濁した。この細胞懸濁液を 1.3×10^5 cells/cm²になるように0.1%ポリエチレンイミンでコーティングしたカバースリップ上に播種し、5%CO₂、37℃の環境下維持した。培養開始日(DIV1)から培養4日目(DIV4)までは10%FCS含有EMEMで、DIV5からDIV12までは10%ウマ血清(HS)含有EMEMで培養した。

(3) 株化細胞の調製と維持

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞およびヒト神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞はそれぞれ5%FCS、10%HS含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)および10%FCS含有DMEM中で、5%CO₂、37℃の環境下培養皿にて維持した。細胞の継代を行う際は、培地を除去し、PC12細胞は0.125%トリプシン-0.5 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液を、SH-SY5Y細胞は0.25%トリプシン-1 mM EDTA溶液を加え、37℃で2~3分間静置した。その後、それぞれの維持培地を加えピペッティングすることにより細胞を培養皿から剥離し単離した。細胞懸濁液を200 × g、5分間遠心した後、上清を除去し新しい維持培地を加え、必要な細胞密度に再懸濁した。播種後、少なくとも24時間静置してから実験に用いた。PC12細胞をガラス上で培養する場合は、予め10 μg/ml ポリ-L-リジンでコーティングしたものをを用いた。

(4) 免疫細胞化学および核染色

培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分間固定した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, pH 7.5)で洗浄し、0.2% Triton X-100含有PBSで細胞膜透過処理を10分間行った。その後、3%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBSで希釈した一次抗体を室温で2時間反応させた。ペルオキシダーゼ-ジアミノベンチジン(DAB)反応による発色の場合、PBSで洗浄後、3%BSA含有PBSで希釈したビオチン標識抗マウスIgG抗体またはビオチン標識抗ウサギIgG抗体(1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を二次抗体として1時間室温にて反応させ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識アビジン-ビオチン複合体(Vector Laboratories)をさらに室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、0.07%DAB、0.018%過酸化水素含有トリス緩衝生理食塩水(TBS; 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 137 mM NaCl, pH 7.5)を室温にて8分間反応させた。蛍光観察の場合、PBSで洗浄後、3%BSA含有PBSで希釈したAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG抗体またはAlexa Fluor 594標識抗ウサギIgG抗体(1:1,000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を二次抗体として1時間室温にて反応させた。核染色として、PBSで洗浄後、0.1 mg/ml Hoechst 33258 (Calbiochem)に15分間浸漬した。

(5) 中脳初代培養細胞における薬物処置および神経毒性の評価

薬物は全て10%HS含有EMEM中で投与した。24時間投与はDIV9から行い、DIV10に薬物不含培地で培地交換した。3日間投与はDIV9から行った。5日間投与はDIV8より行い、DIV10に薬物含有培地で再度処置した。薬物処置後の細胞はDIV12に、ウサギ由来抗チロシンヒドロキシラーゼ(TH)抗体(1:400, Chemicon International, Temecula, CA, USA)またはマウス由来抗microtubule-associated protein 2 (MAP2)抗体(1:400, Sigma)を用い免疫染色を行った。中脳腹側部から作製した中脳培養系で、抗TH抗体で染色される細胞はドパミンニューロンのみであることが知られているので、TH陽性細胞をドパミンニューロンとした。図1-2の染色像からも分かるように、ニューロンのマーカーであるMAP2陽性細胞のうちTH陽性細胞が占める割合は2-3%であるため、実験の便宜上、MAP2陽性細胞を非ドパミンニューロンとした。神経毒性の評価として、免疫染色により染色された生存ニューロンを顕微鏡下で計数し、sham処置群の細胞数に対する割合(生存率)で表した。

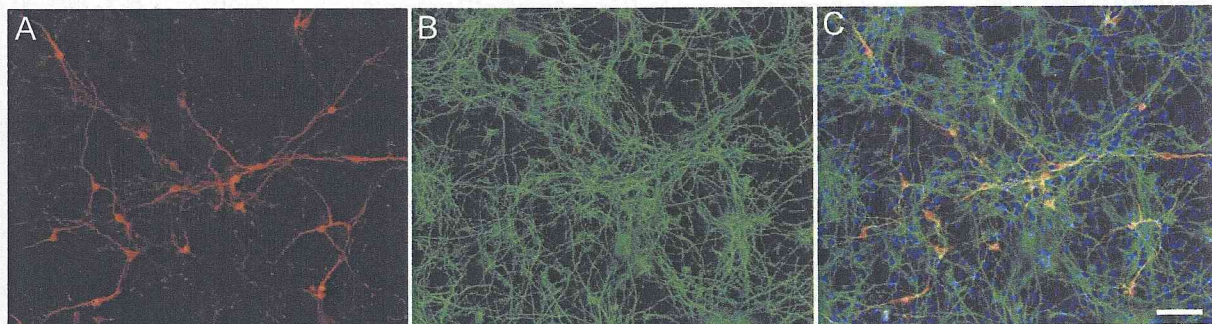


図 1-2 中脳初代培養細胞における免疫染色像

AはTH(赤色)を、BはMAP2(緑色)を示す。CはTH(赤色)、MAP2(緑色)およびHoechst 33258 (青色)をmergeさせた蛍光画像。スケールバーは200 μm を示す。

(6) 株化細胞における毒性の評価

株化細胞における毒性の評価はMTT assayにより行った。MTTは、細胞内の脱水素酵素により還元され、青色の不溶性ホルマザンを生成し、このホルマザン量は生存細胞数に依存して増加するため、溶解液の吸光度は生存細胞数を比例関係的に反映する。薬物処置後の細胞を、MTT(0.5 mg/ml)含有血清不含DMEM中で、PC12細胞は30分間、SH-SY5Y細胞は90分間、37°Cで反応させた。イソプロパノールで細胞を可溶化し、生成したホルマザン色素を漏出させ、マイクロプレートリーダーで吸光度(595 nm)を測定した。Sham処置群における吸光度を100%として生存率を算出した。

また、一部の実験では、細胞傷害の指標として培地中への乳酸脱水素酵素(LDH)遊離量を、微量毒性試験用試薬MTX “LDH” (Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan)を用いて測定した。細胞が傷

害を受けて細胞膜が破壊されると、生存細胞において細胞質に局在するLDHが細胞外に遊離される。薬物処置後の培地を10 µl回収し、90 µlの発色試薬と室温で、PC12細胞の場合、30分間反応させた。100 µlの1 N HClを添加し反応を停止し、マイクロプレートリーダーで吸光度(570 nm)を測定した。Sham処置群における吸光度を100%としてLDH遊離量を表した。

(7) カテコラミンおよびその代謝物の測定

細胞内カテコラミンおよびその代謝物の調製のために、細胞をTBSで回収し、抽出溶液(0.1 N perchloric acid, 10 mM sodium disulfite, 1 mM EDTA)中で超音波破碎を行った。4°C、17,000 × gで30分間遠心分離し、その上清をサンプルとした。沈殿は0.2% Triton X-100含有PBSで再懸濁し、Bradford法を用いたBio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)によりタンパク定量を行った。細胞外カテコラミンおよびその代謝物の調製のために、薬物処置後の培地45 µlに5 µlの10倍濃度の抽出溶液を加え、4°C、17,000 × gで30分間遠心分離した上清をサンプルとした。

測定は、エイコム300シリーズ分析システム(脱気装置DG-300、ポンプシステムEP-300、カラム恒温槽ATC-300、オートインジェクターEAS-20、電気化学検出器ECD-300、解析ソフトウェアEPC-300)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより行った。移動相として、17% メタノール、210 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム及び5 mg/l EDTAを含有する0.1 M クエン酸-0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液を用い、0.23 ml/minの流速で灌流した。サンプルはオートサンプリングインジェクタ(M231XL)を用い注入し、分離カラムEICOMPACK CA-50DS (2.1 mm inner diameter × 150 mm length)による分離後、グラファイト電極(WE-3G)を装着した電気化学検出器(作用電極: +750 mV、参照電極: Ag/AgCl、感度: 0.5 nA)により検出した。分離カラムはカラム恒温槽により25°Cに保った。得られたクロマトグラムピークは解析ソフトウェアを用いて定量し、タンパク量により補正した。

(8) [³H]標識ドパミンの細胞内取込および遊離量の測定

ドパミン分解を防ぐため、実験は全て、10 µM パルギリン、1mM アスコルビン酸含有Krebs-Ringer緩衝液(137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 25 mM D-glucose, pH 7.4)中で行った。細胞をKrebs-Ringer緩衝液で洗浄後、50 nM [³H]標識ドパミン含有Krebs-Ringer緩衝液で37°C、30分間インキュベートし、さらに、Krebs-Ringer緩衝液で4回洗浄した。細胞内取込量を測定する場合は、0.4% Triton X-100で細胞を溶解し、細胞に取り込まれた[³H]標識ドパミンを液体シンチレーションカウンターにより定量した。遊離量を測定する場合は、引き続きKrebs-Ringer緩衝液中で37°C、30分間でインキュベートし、遊離された[³H]標識ドパミンを液体シンチレーションカウンターにより定量した。

(9) ウェスタンブロッティング

薬物処置後の細胞をTBSで洗浄後、氷冷した細胞溶解液(20 mM Tris, 25 mM β-glycerophosphate, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM vanadate, 1% aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM dithiothreitol, pH 7.0)を用いて回収し、4°C、17,000 × gで30分間遠心分離することによりタンパク上清を得た。Bio-Rad Protein Assay kitによりタンパク濃度を揃えた後、タンパク上清液と等量のサンプル緩衝液(124 mM Tris, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 4% 2-mercaptoethanol, pH 6.8)を混合し、5分間煮沸することでタンパクの変性とSDS化を行った。電気泳動はSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動液(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)中で90分間20 mAの電流を流すことにより行った。分離されたタンパクは転写液(100 mM Tris, 192 mM glycine, 5% methanol)中で15 Vの電圧を70分間かけることによりポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜(Millipore, Billerica, MA, USA)に転写した。転写後のPVDF膜は、0.1% Tween20含有TBS (TBS-T)で洗浄し、5%スキムミルク含有TBS-Tを用い室温、1時間ブロッキング処理を施した。その後、一次抗体液と4°Cで一晩または室温1時間反応させた。一次抗体液として、マウス由来抗TH抗体(1:10,000, Sigma)、ウサギ由来抗phospho-Ser19 TH抗体(1:1,000, PhosphoSolutions, Aurora, CO, USA)、ウサギ由来抗phospho-Ser31 TH抗体(1:1,000, PhosphoSolutions)、ウサギ由来抗phospho-Ser40 TH抗体(1:1,000, PhosphoSolutions)、マウス由来

抗phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204)抗体(1:2,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ウサギ由来抗 phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)抗体(1:1,000, Cell Signaling Technology)、ウサギ由来抗 phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)抗体(1:1,000, Cell Signaling Technology)およびマウス由来抗glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase抗体(GAPDH; 1:50,000, Ambion, Austin, TX, USA)を5%スキムミルク含有TBS-Tに希釈して用いた。一次抗体反応後、PVDF膜をTBS-Tで3回洗浄し、二次抗体液と室温で1時間反応させた。二次抗体として、HRP標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体(1:2,000, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)を5%スキムミルク含有TBSTに希釈して用いた。二次抗体反応後、PVDF膜をTBS-Tで3回洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (Plus) Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)を用い、X線フィルム(Fujifilm, Tokyo)に感光させ、レンドール(Fujifilm)およびレンフィックス(Fujifilm)により現像・定着することにより検出した。シグナル強度はImageJ 1.33u (National Institutes for Health (NIH), Bethesda, MD, USA)を用いて解析した。

(10) TH活性の測定

THにより生成したL-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-ドーパ)は芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素によりドパミンに変換される。芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素を阻害するとL-ドーパが蓄積する。薬物処置後の細胞を、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬S(-)-カルビドパ(200 μ M)で引き続き1時間処置し、第一章の実験方法(7)と同様の方法で、細胞内L-ドーパ量を定量した。S(-)-カルビドパ処置後から処置前のL-ドーパ量を引き、蓄積量をTH活性として評価した。

(11) MAO活性の測定

細胞内のMAOは主にミトコンドリアに局在する。細胞をTBSで回収しホモジナイズ後、4℃、1,000 \times gで10分間遠心し細胞片と核を沈降させた。上清を4℃、10,000 \times gで10分間遠心し得られたペレットをTBSで再懸濁しミトコンドリア画分とした。Bio-Rad Protein Assay kitによりミトコンドリア画分のタンパク濃度を揃えた後、MAO活性はAmplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit (Molecular Probes)により測定した。ミトコンドリア画分と等量の作用液(100 μ M Amplex red, 0.5 U/ml HRP, 2 mM *p*-tyramine)を加え、室温で10分間反応させた。Amplex Redは反応により蛍光物質であるレゾルフィンに酸化される。生成したレゾルフィンの蛍光強度を励起波長544 nm、蛍光波長590 nmで蛍光測定器(FLEXstation, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)を用いて測定した。

(12) アルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性の測定

ミトコンドリアに存在するALDH-2は細胞内でのドパミン分解に主要な役割を担っている。細胞をTBSで回収しホモジナイズ後、4℃、1,000 \times gで10分間遠心し細胞片と核を沈降させた。上清を4℃、10,000 \times gで10分間遠心したペレットを50 mM ピロリン酸ナトリウム水溶液 (pH 8.1)で再懸濁しミトコンドリア画分とした。Bio-Rad Protein Assay kitによりミトコンドリア画分のタンパク濃度を揃えた後、ミトコンドリア画分と等量の作用液(200 μ M nicotinamide adenine dinucleotide, 200 μ M 6-methoxy-2-naphthaldehyde)を加え、室温で5時間反応させた。6-メトキシ-2-ナフトアルデヒドはALDHにより、特徴的な蛍光スペクトルを有する6-メトキシ-2-ナフトアートに酸化される[19]。生成した6-メトキシ-2-ナフトアートの蛍光強度を励起波長280 nm、蛍光波長360 nmで蛍光測定器(FLEXstation)を用いて測定した。

(13) 統計処理

データは全て、平均値 \pm 標準誤差で表した。統計学的な有意差は、特に明記しない限り一元配置分散分析法後のTukey testにより評価した。全ての実験において危険率5%未満の際に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

第一節 ロテノン誘発ドパミンニューロン選択毒性の発現機序

中脳初代培養細胞における高濃度ロテノン毒性

ミトコンドリア複合体 I 活性は100 nM以上の濃度のロテノンによりほぼ完全に抑制される[20]。中脳初代培養細胞に高濃度(100-300 nM)ロテノンを24時間投与したところ、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンともに濃度依存的に生存率が減少した(図1-3A-E)。これらの濃度範囲において、ドパミンニューロンは非ドパミンニューロンに比べロテノン毒性に対し抵抗性を示した。以下の24時間投与の実験では、ドパミンニューロンに対しては300 nM、非ドパミンニューロンに対しては100 nMのロテノンをを用いた。

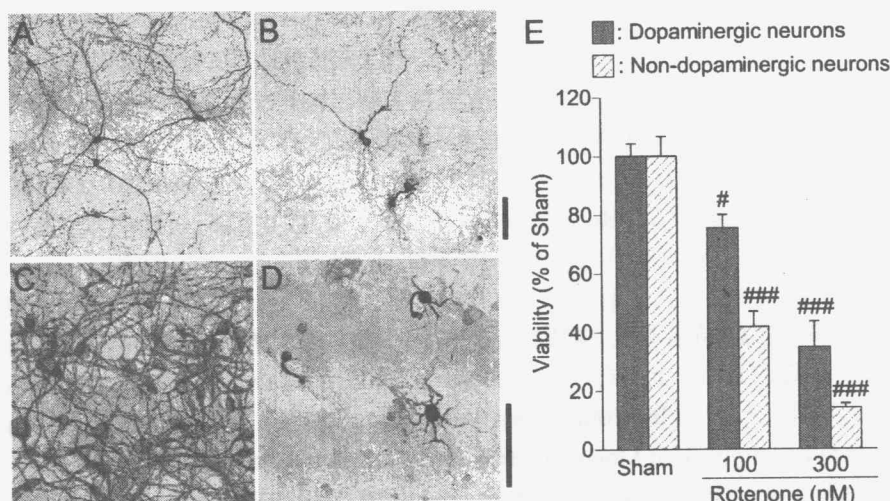


図 1-3 中脳初代培養細胞における高濃度ロテノン毒性

ドパミンニューロン(A,B)および非ドパミンニューロン(C,D)の免疫染色像である。写真は各々、sham 処置群(A,C)およびロテノン(300 nM)処置群である(B,D)。スケールバーは100 μ mを示す。E: 高濃度ロテノンによる細胞生存率への影響。培養細胞にロテノン(100-300 nM)を24時間曝露した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. sham.

高濃度ロテノン毒性におけるスーパーオキシドの関与

ロテノンによるミトコンドリア複合体 I の障害は、スーパーオキシドの生成を増大させることが報告されている[21]。そこで、高濃度ロテノン24時間投与により惹起される神経毒性へのスーパーオキシドの関与を検討するため、膜透過性スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)類似体であるMn-TBAP [22]による影響を検討した。Mn-TBAP (100-300 μ M)をロテノンと同時に24時間投与したところ、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの生存率はともに濃度依存的に回復した(図1-4A,B)。

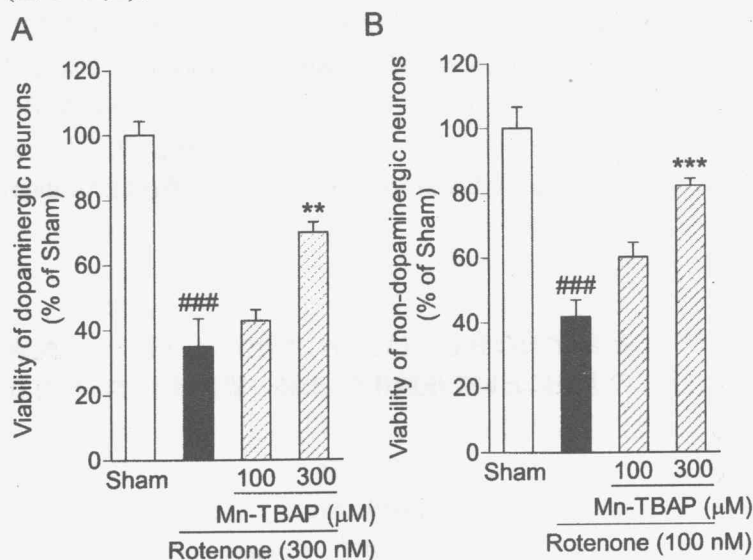


図 1-4 高濃度ロテノン毒性に対するMn-TBAPの作用

ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対するMn-TBAPの影響。培養細胞にロテノンと同時にMn-TBAP (100-300 μ M)を24時間曝露した。### $P < 0.001$ vs. sham. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. rotenone alone.

高濃度ロテノン毒性における内在性ドパミンの関与

高濃度ロテノン 24 時間投与により惹起される神経毒性への内在性ドパミンの関与を検討するため、ドパミン生合成の律速酵素である TH の阻害薬 α -MT の作用を調べた。中脳初代培養細胞に α -MT (0.1, 1 mM) を 24 時間投与したところ、ドパミン含有量はそれぞれ 51.4 ± 8.3 , 14.2 ± 1.4 % にまで減少した。 α -MT (0.1-1 mM) を 24 時間前投与した後、さらにロテノンと α -MT を同時に 24 時間投与したところ、ドパミンニューロンにおける高濃度ロテノン毒性は部分的に抑制されたが、非ドパミンニューロンでは抑制されなかった(図 1-5A,B)。

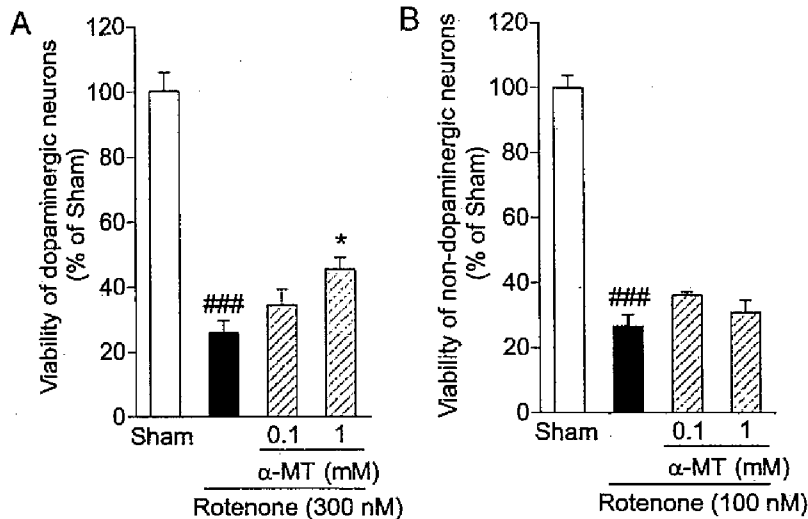


図 1-5 高濃度ロテノン毒性に対する α -MT の作用

ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対する α -MT の影響。 α -MT (0.1-1 mM) はロテノン投与の 24 時間前から、ロテノンと同時に 24 時間に処置した。### $P < 0.001$ vs. sham. * $P < 0.05$ vs. rotenone alone.

中脳初代培養細胞における低濃度ロテノン毒性

パーキンソン病患者においてミトコンドリア複合体I活性はおおよそ70%まで低下する[5]。そこで、複合体Iを部分的に抑制する10 nM以下の濃度のロテノンをを用いた[20]。低濃度(1-10 nM)のロテノンを中脳初代培養細胞に3-5日間投与した。投与3日まではいずれのニューロンにおいても生存率の変化はなかったが、5日間投与するとドパミンニューロンにおいてのみ生存率が有意に低下した。(図1-6A,B)。

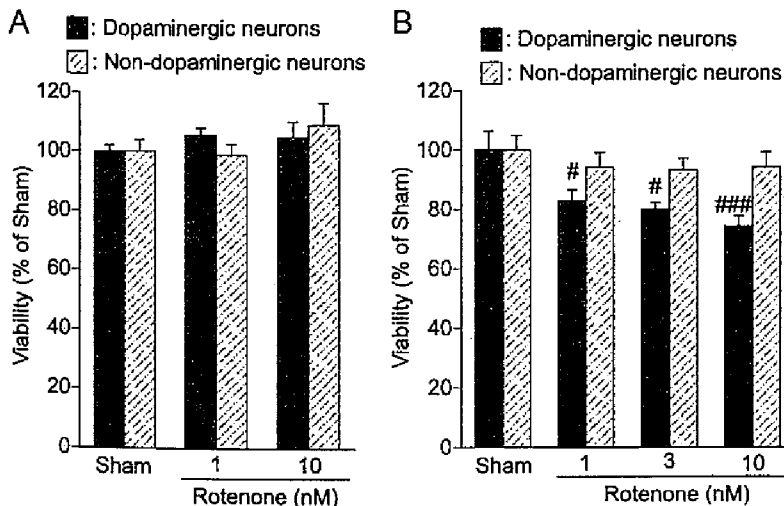


図 1-6 中脳初代培養細胞における低濃度ロテノン毒性

培養細胞にロテノン(1-10 nM)を 3 日間(A)および 5 日間(B)曝露した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. sham.

低濃度ロテノン毒性における内在性ドパミンの関与

低濃度ロテノンの 5 日間投与による選択的ドパミンニューロン死への内在性ドパミンの関与を検討した。 α -MT (0.1-1 mM) をロテノンと同時に 5 日間投与することにより、ドパミンニューロンにおける低濃度ロテノン毒性は濃度依存的に抑制された(図 1-7A-G)。

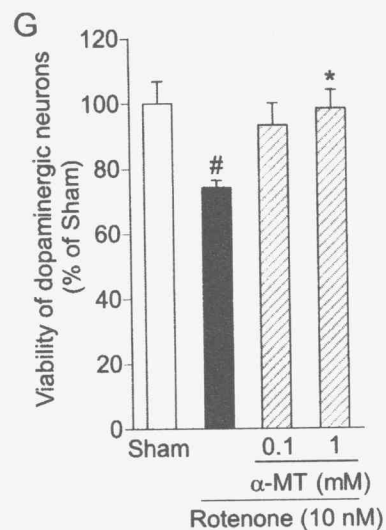
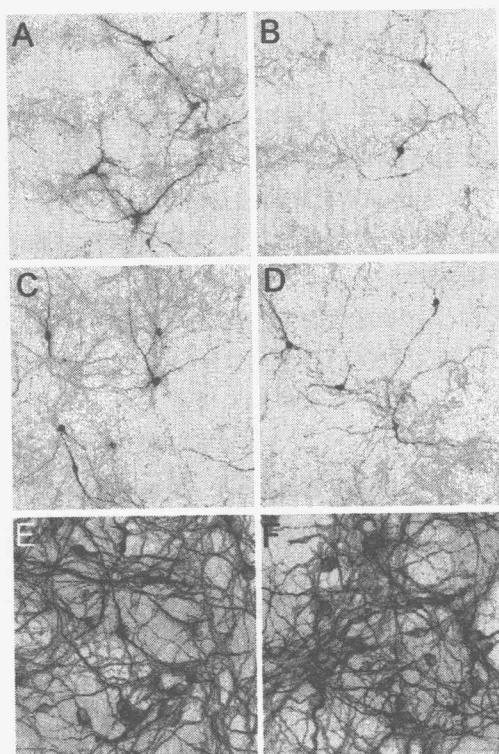


図 1-7 低濃度ロテノン毒性に対する α -MT の作用

A-F: 写真は、ドパミンニューロン(A-D)および非ドパミンニューロン(E,F)の免疫染色像である。各々、sham 処置群(A,E)、ロテノン(10 nM)処置群(B,F)、 α -MT (1 mM)処置群(C)、ロテノン+ α -MT (1 mM)処置群(D)である。スケールバーは 100 μ m を示す。G: ドパミンニューロンの生存率における低濃度ロテノンに対する α -MT の影響。 α -MT (0.1-1 mM)はロテノンと同時に 5 日間処置した。[#] $P < 0.05$ vs. sham. ^{*} $P < 0.05$ vs. rotenone alone.

第二節 パラコート誘発細胞死における内在性ドパミンの役割

PC12 細胞および SH-SY5Y 細胞におけるパラコート毒性

パラコート毒性に対するドパミン含有細胞の脆弱性を明らかにするため、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞およびヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を比較検討した。これらの細胞株における TH 発現はマウス由来抗 TH 抗体(1:1,000, Sigma)を用いた免疫染色により検討した。PC12 細胞は未分化の状態でも全ての細胞が TH を発現し、ドパミンを産生していた(図 1-8A)。一方、過去の報告と一致して[23]、SH-SY5Y 細胞は未分化の状態では TH 発現は観察されず、スタウロsporin(10 nM)にて 12 日間分化誘導した場合およそ 60%の細胞が TH を発現し、ノルアドレナリンを産生した(図 1-8B,C)。PC12 細胞及び未分化の SH-SY5Y 細胞にパラコート(10-300 μ M)を 48 時間曝露したところ、いずれの細胞種においても濃度依存的な細胞死が惹起されたが(図 1-9A,B)、PC12 細胞は SH-SY5Y 細胞に比べ、パラコート毒性に対し脆弱であった。以降の実験では PC12 細胞を用いた。

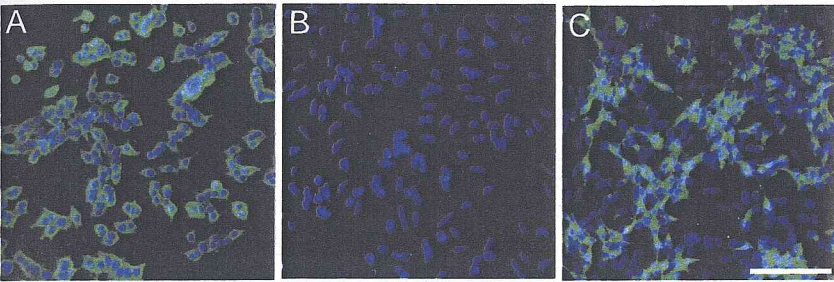


図 1-8 PC12 細胞および SH-SY5Y 細胞における TH 発現
PC12 細胞(A)および SH-SY5Y 細胞(B,C)を TH(緑色)で免疫染色し、Hoechst 33258(青色)で核染色した。C: SH-SY5Y 細胞をスタウロsporin(10 nM)で 12 日間分化誘導した。スケールバーは 100 μ m を示す。

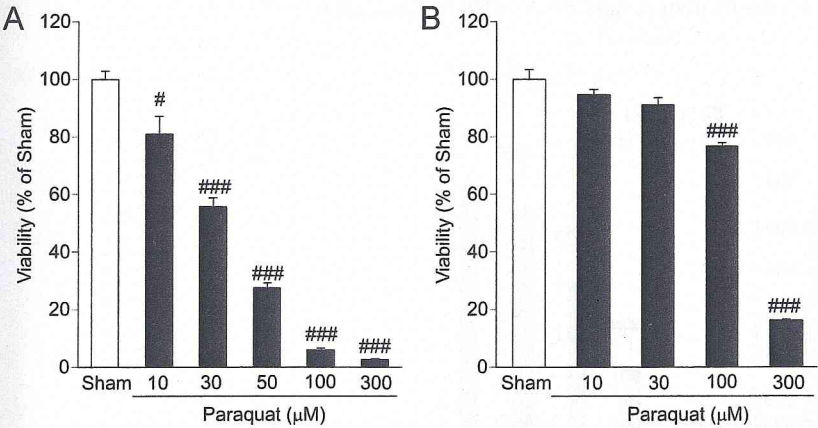


図 1-9 PC12 細胞および SH-SY5Y 細胞におけるパラコート毒性
PC12 細胞(A)および SH-SY5Y 細胞(B)にパラコート(10-300 μ M)を 48 時間曝露した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. sham.

パラコート毒性における活性酸素種(ROS)の関与

パラコート誘発細胞死にはスーパーオキシドが重要な役割を果たしていることが報告されている[24]。そこで、PC12 細胞におけるパラコート毒性に ROS の関与を検討するために、Mn-TBAP (100 μ M)および SOD/カタラーゼ類似体である EUK-134 (10 μ M)をパラコートと同時に適用した。しかし、いずれの抗酸化薬もパラコート毒性を抑制しなかった(図 1-10A,B)。

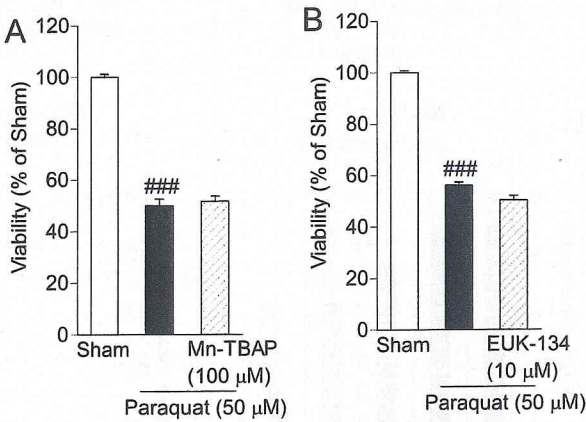


図 1-10 パラコート毒性に対する Mn-TBAP および EUK-134 の作用
PC12 細胞に Mn-TBAP (100 μ M; A)および EUK-134 (10 μ M; B)をパラコート(50 μ M)と同時に 48 時間曝露した。### $P < 0.001$ vs. sham.

パラコート毒性における内在性ドパミンの関与

パラコート毒性に対する PC12 細胞の脆弱性に内在性のドパミンが関与するか検討するために、 α -MT および小胞モノアミントランスポーター(VMAT)阻害薬であるレセルピンを用い細胞内ドパミンを枯渇させた。PC12 細胞に α -MT (0.1-1 mM)を 24 時間投与したところ、ドパミン含有量は濃度依存的に減少し、レセルピン(10 μ M)を投与するとほぼ完全に細胞内ドパミンを枯渇した(図 1-11)。 α -MT(0.1-1 mM)を 24 時間前投与した後、さらにパラコートと α -MT を同時に 48 時間投与したところ、細胞生存率は濃度依存的に回復した(図 1-12)。 α -MT(1 mM)またはレセルピン(10 μ M)により細胞内ドパミンを枯渇させると、PC12 細胞はパラコート毒性に対し抵抗性を示し、同様に、細胞傷害の指標である LDH 遊離も抑制された(図 1-13A,B)。

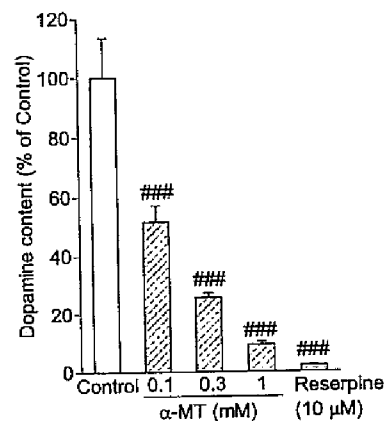


図 1-11 ドパミン含有量に対する α -MT およびレセルピンの作用

PC12 細胞を α -MT(0.1-1 mM)またはレセルピン(10 μ M)で 24 時間処置した。### $P < 0.001$ vs. control.

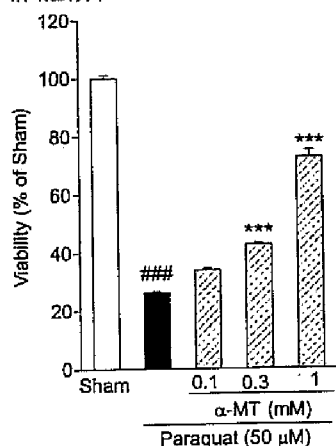


図 1-12 パラコート毒性に対する α -MT による保護作用の濃度依存性

α -MT(0.1-1 mM)はパラコート投与の 24 時間前から、パラコートと同時に 48 時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham. *** $P < 0.001$ vs. paraquat alone.

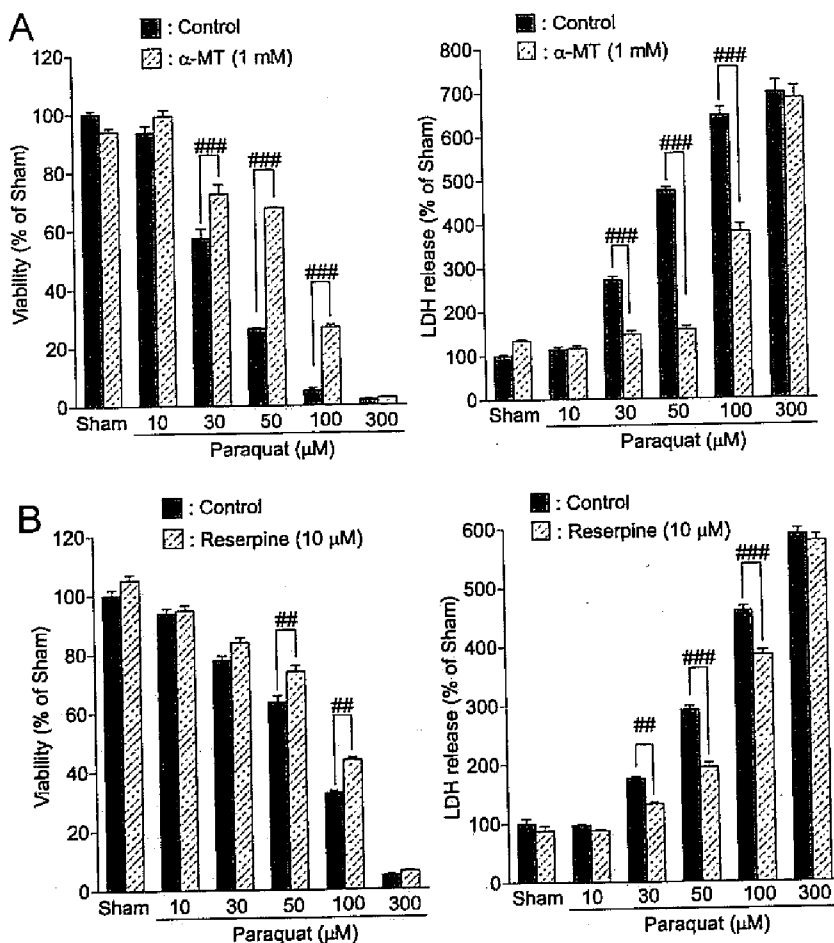


図 1-13 パラコート毒性に対する α -MT およびレセルピンの作用

(A) α -MT(1 mM)または(B)レセルピン(10 μ M)はパラコート投与の 24 時間前から、パラコートと同時に 48 時間処置した。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

パラコート毒性の時間依存性

パラコート(50 μ M)の処置時間を0-48時間と変えて検討したところ、生存率は処置12時間後では低下せず、その後、処置時間に依存して低下した(図1-14A)。次に、パラコート(50 μ M)を3-12時間投与した後薬物不含培地に置換し、48時間後まで培養した。パラコート(50 μ M)を6-12時間処置すると、その後パラコートを除去しても遅延性に細胞死が惹起された(図1-14B)。したがって、パラコート処置12時間以内に細胞死を誘導する機序がすでに働いているものと考えられる。

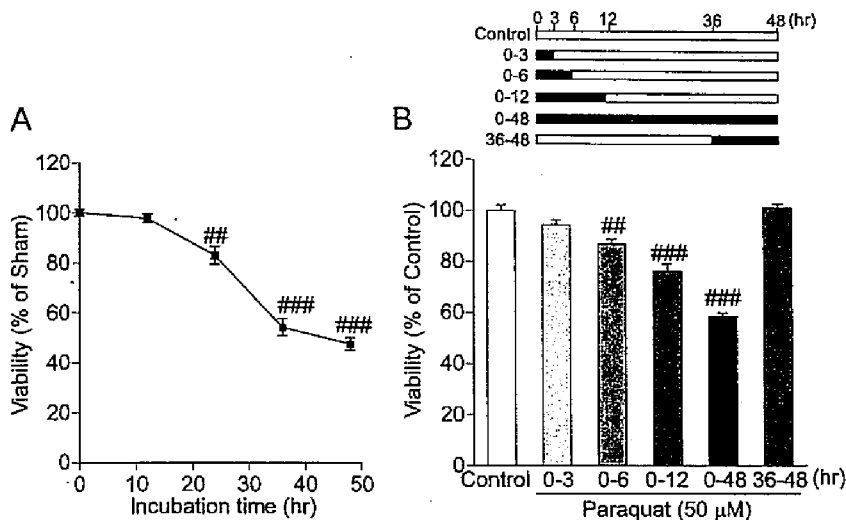


図 1-14 パラコート毒性の時間依存性
(A)パラコート(50 μ M)を横軸に示した時間投与した。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. sham. (B)パラコート(50 μ M)をグラフに示した期間投与し、それ以外は薬物不含培地で培養した。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. control.

細胞内ドパミンに対するパラコートの作用

パラコート毒性に内在性ドパミンが関与していることから、パラコート(50 μ M)処置時の細胞内ドパミン量の経時変化について検討した。ドパミン含有量はパラコート処置3時間後から有意に上昇し、9時間後にピークに達し、24時間後には処置前のレベルまで戻っていた(図1-15)。

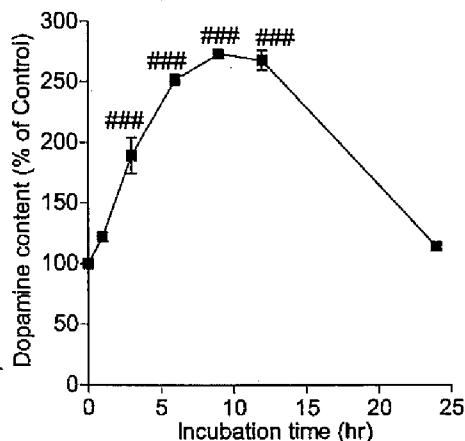


図 1-15 パラコート処置後の細胞内ドパミンの経時変化

パラコート(50 μ M)を横軸に示した時間投与した後、細胞内ドパミン量を測定した。### $P < 0.001$ vs. control (time 0).

細胞外ドパミンおよびその代謝物に対するパラコートの作用

パラコートによる細胞内ドパミンの変化に対応して、細胞外ドパミンおよびその代謝物である3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)およびホモバニリン酸(HVA)がどのように変化するか検討した。細胞外遊離量は細胞死が検出されない12時間後まで定量した。細胞外ドパミン濃度は、コントロール群において処置3時間後にはプラトーに達したが、パラコート処置群では6時間後以降も増加した(図1-16A)。細胞外DOPAC濃度は、処置時間依存的に上昇したが、パラコート処置群ではコントロール群に比べ有意に低かった(図1-16B)。また、細胞外HVA濃度は、処置時間依存的に上昇し、パラコート処置により影響を受けなかった(図1-16C)。

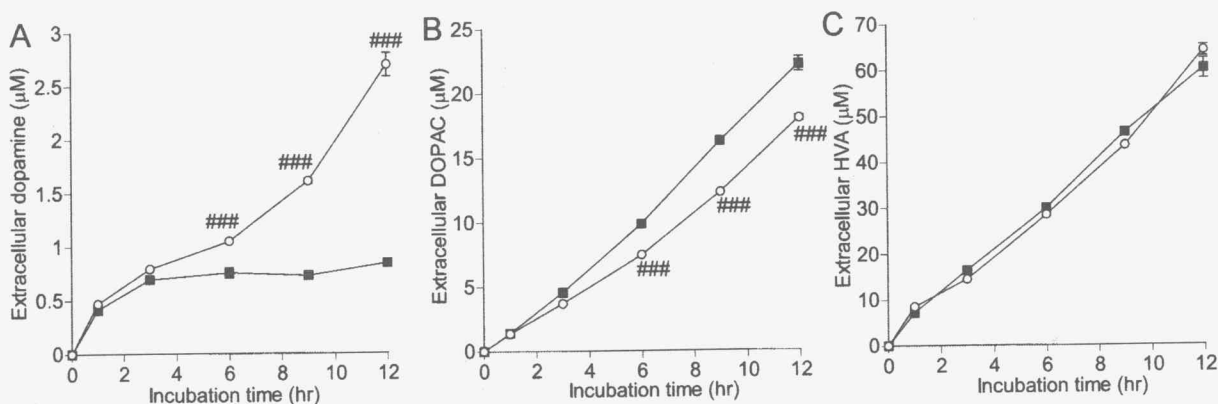


図 1-16 パラコート処置後の細胞外ドパミンおよびその代謝物の経時変化

パラコート(50 μ M)を横軸に示した時間投与した後、細胞外ドパミン(A)、DOPAC (B)、HVA (C)濃度を測定した。コントロール群(■)、パラコート(50 μ M)処置群(O)。有意差検定は二元配置分散分析法後の Bonferroni test により評価した。### $P < 0.001$ vs. control.

ドパミン生合成に対するパラコートの作用

パラコートによるドパミン含有量の増加が、生合成の亢進によるものかを検討した。ドパミン生合成は律速酵素THの遺伝子発現およびリン酸化による転写後調節により制御されている[25]。PC12細胞にパラコート(50 μ M)を3-12時間曝露しても、THの総タンパク量およびリン酸化TH量に変化はなかった(図1-17A)。TH活性もまた、パラコート(50 μ M)の1-6時間処置により影響を受けなかった(図1-17B)。 α -MT(1 mM)はポジティブコントロールとして用いた。

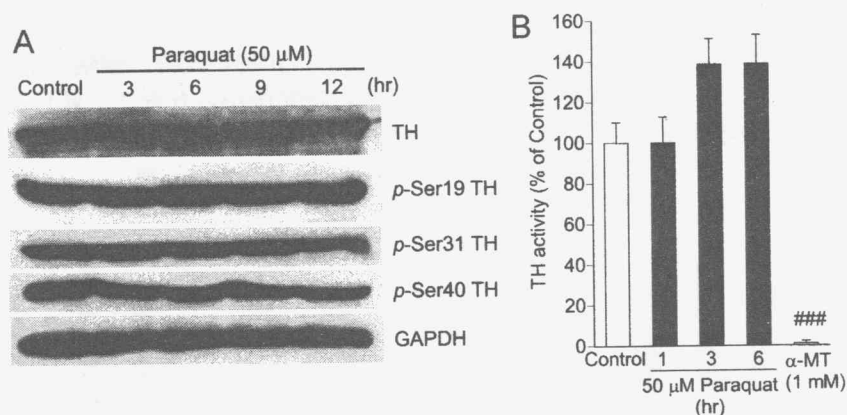


図 1-17 TH リン酸化およびTH活性に対するパラコートの作用

(A)パラコート(50 μ M)を示した時間投与した後の TH、リン酸化 TH(p-Ser TH)およびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のウェスタンブローディング像。(B) パラコート(50 μ M)を示した時間または α -MT (1 mM)を6時間投与した後の TH 活性。### $P < 0.001$ vs. control.

$[^3\text{H}]$ 標識ドパミン取込および遊離に対するパラコートの作用

パラコートによるドパミン含有量の増加に、ドパミンの細胞内取込または遊離が関与するか検討した。 $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの細胞内への取込は DAT 阻害薬 GBR12909(2 μ M)/ノルアドレナリントランスポーター阻害薬デシプラミン(2 μ M)により抑制されたが、パラコート(50 μ M)では変化はなかった(図 1-18A)。 $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの遊離もまた、パラコート(50-100 μ M)処置によりほとんど影響を受けなかった(図 1-18B)。

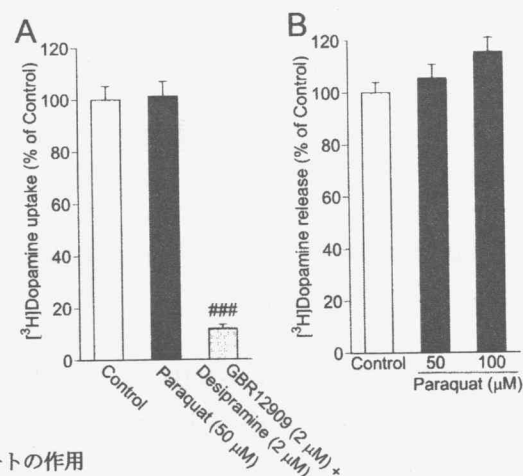
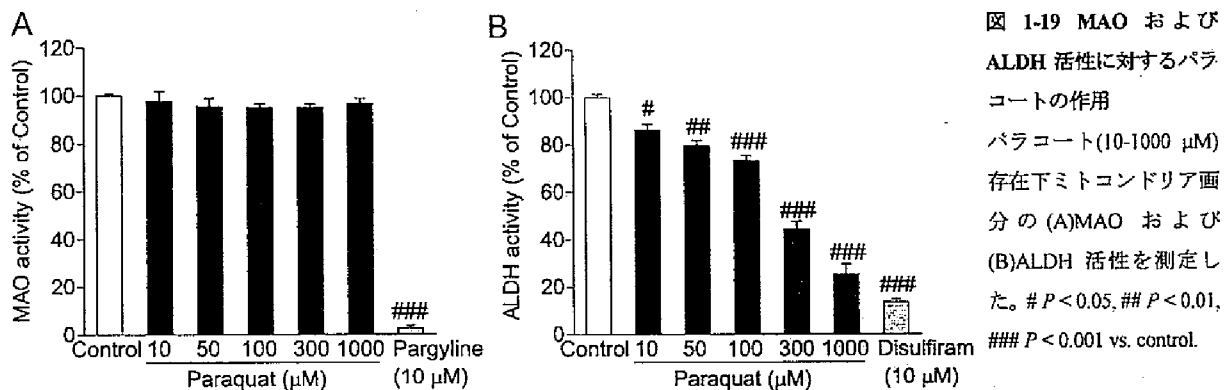


図 1-18 ドパミン取込および遊離に対するパラコートの作用

(A)パラコート(50 μ M)または GBR12909 + デシプラミン(2 μ M)存在下、細胞に $[^3\text{H}]$ ドパミンを30分間取り込ませた。(B) $[^3\text{H}]$ ドパミンを細胞に取り込ませた後、パラコート(50-100 μ M)を投与した。### $P < 0.001$ vs. control.

ドパミン分解酵素に対するパラコート作用

パラコートによるドパミン含有量の増加は、ドパミン分解の抑制に起因する可能性がある。細胞内ドパミンは、ミトコンドリアのMAOにより非常に不安定で反応性の高い3,4-ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド(DOPAL)に変換され、さらに、DOPALは主としてミトコンドリアのALDHによりDOPACに酸化される[26]。PC12細胞のミトコンドリア画分を調製し、これらのドパミン分解酵素に対するパラコートの作用を検討した。パラコート(10-1000 μ M)はMAO活性を抑制しなかったが、ALDH活性を濃度依存的に阻害した(図1-19A,B)。MAO阻害薬パルギリン(10 μ M)およびALDH阻害薬ジスルフィラム(10 μ M)はポジティブコントロールとして用いた。



パラコート毒性におけるALDHの関与

パラコートによるALDH活性阻害が細胞毒性に寄与するかを確認する目的で、パラコート毒性に対するジスルフィラムの作用を検討した。単独では生存率に影響を及ぼさないジスルフィラム(10 μ M)はパラコート毒性を有意に増悪した(図1-20)。

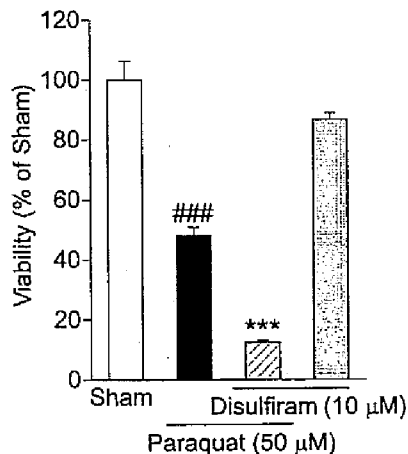


図 1-20 パラコート毒性に対するジスルフィラムの作用

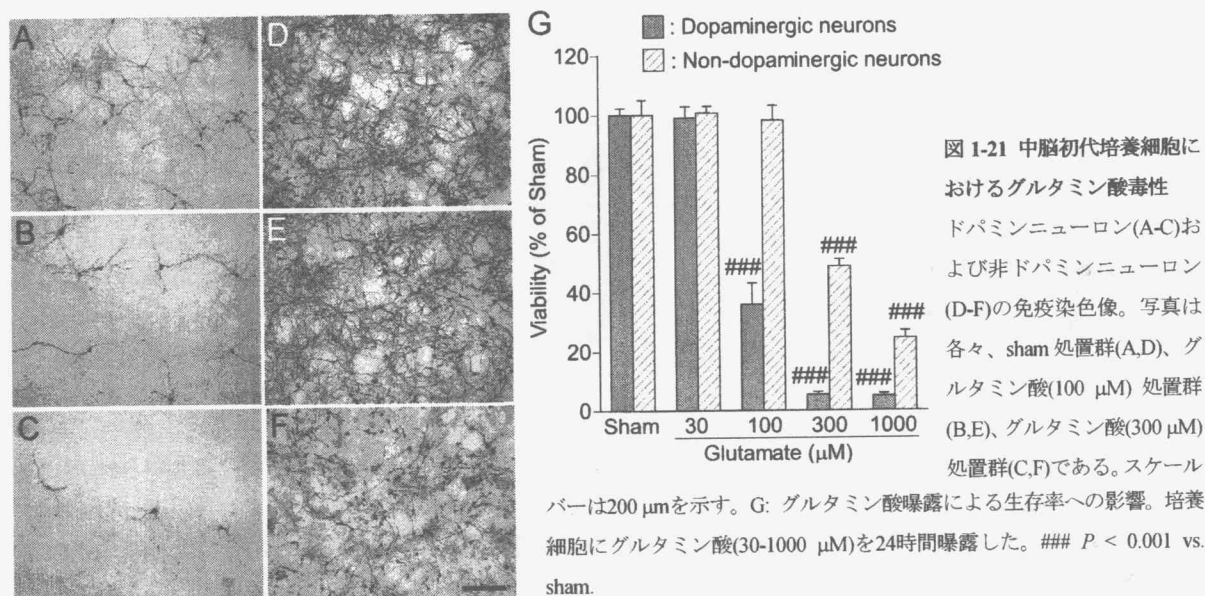
ジスルフィラム(10 μ M)はパラコート(50 μ M)と同時に 48 時間適用した。

$P < 0.001$ vs. sham, *** $P < 0.001$ vs. paraquat alone.

第三節 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死の機序

中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸毒性に対するドパミンニューロンの脆弱性

中脳初代培養細胞にグルタミン酸(30-1000 μM)を24時間曝露すると、ドパミンニューロンにおいては100 μM の濃度から細胞毒性を発現したが、非ドパミンニューロンにおいては100 μM ではほとんど影響は無く300 μM の濃度から生存率が低下した(図1-21A-G)。以降の実験では、ドパミンニューロンに対しては100 μM 、非ドパミンニューロンに対しては300 μM のグルタミン酸を用いた。



グルタミン酸毒性におけるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の関与

グルタミン酸の曝露は、グルタミン酸受容体を介したカチオン透過性の亢進による興奮毒性[27]、または、シスチン/グルタミン酸トランスポーター阻害による細胞内グルタチオン低下のための酸化ストレス[28]により細胞死を誘発することが知られている。中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸毒性の機序解明のためグルタミン酸受容体アンタゴニストの作用を検討した。イオンチャネル型グルタミン酸受容体はNMDA感受性のNMDA受容体と非感受性のnon-NMDA受容体に大別される。ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンのいずれにおいても、グルタミン酸により誘発される神経細胞死はNMDA受容体アンタゴニストであるMK-801 (1-10 μM)によりほぼ完全に抑制され、non-NMDA受容体アンタゴニストであるNBQX (1-10 μM)により一部抑制された(図1-22A,B)。

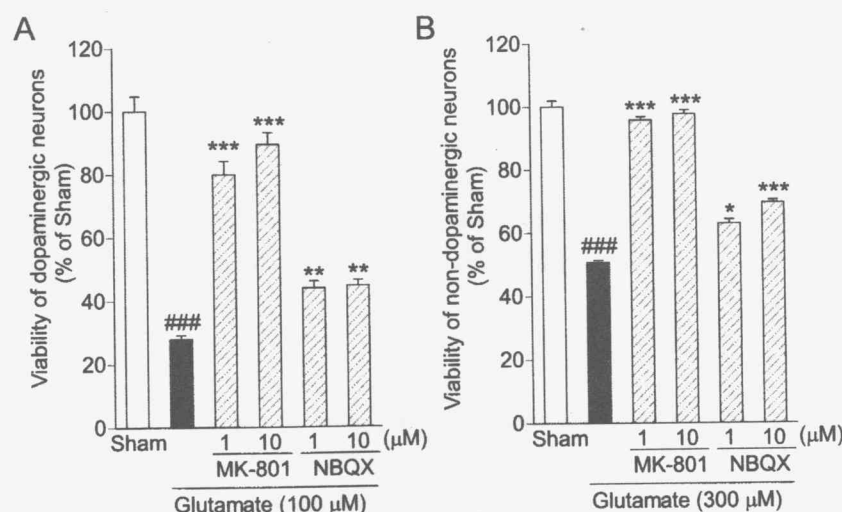


図1-22 グルタミン酸毒性に対するグルタミン酸受容体アンタゴニストの作用
ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対するMK-801およびNBQXの影響。MK-801 (1-10 μM)またはNBQX (1-10 μM)はグルタミン酸投与の1時間前から、グルタミン酸と同時に24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

さらに、カルシウム選択的なキレート剤であるEGTA (2 mM)により細胞外カルシウムを捕捉するとグルタミン酸毒性は顕著に抑制された(図1-23A,B)。これらの結果より、中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸毒性の発現には、NMDA受容体を介した細胞内へのカルシウム流入が重要な役割を果たすことを示唆された。

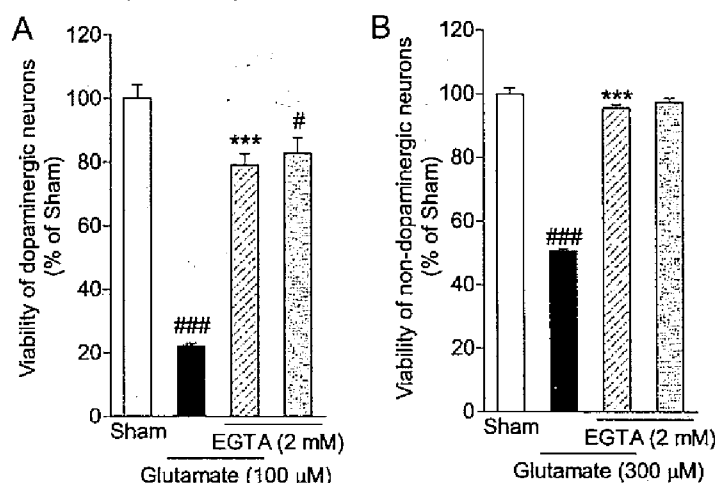


図1-23 グルタミン酸毒性に対する細胞外カルシウムの作用

ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対するEGTAの影響。EGTA (2 mM)はグルタミン酸と同時に24時間処置した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. sham, *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

グルタミン酸神経毒性におけるカルシウム依存性酵素の役割

NMDA受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇は、様々なカルシウム依存性酵素を活性化させる。例えば、NO合成酵素(NOS)、カルパイン、ホスホリパーゼA₂、カルシニューリン、プロテインキナーゼC (PKC) がカルシウム依存性細胞死の要因として想定されている[29]。これらの酵素がグルタミン酸神経毒性に寄与するか検討した。NOS阻害薬L-NNA (300 μ M)、カルパイン阻害薬MDL28170 (1 μ M)、ホスホリパーゼA₂阻害薬AACOCF₃ (5 μ M)はグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死を抑制しなかったが、カルシニューリン阻害薬FK-506 (1 μ M)およびPKC阻害薬BIM (1 μ M)は有意な保護作用を示した(図1-24A)。非ドパミンニューロンに対する毒性もまたFK-506 (1 μ M)およびPKC阻害薬BIM (1 μ M)により抑制された(図1-24B)。

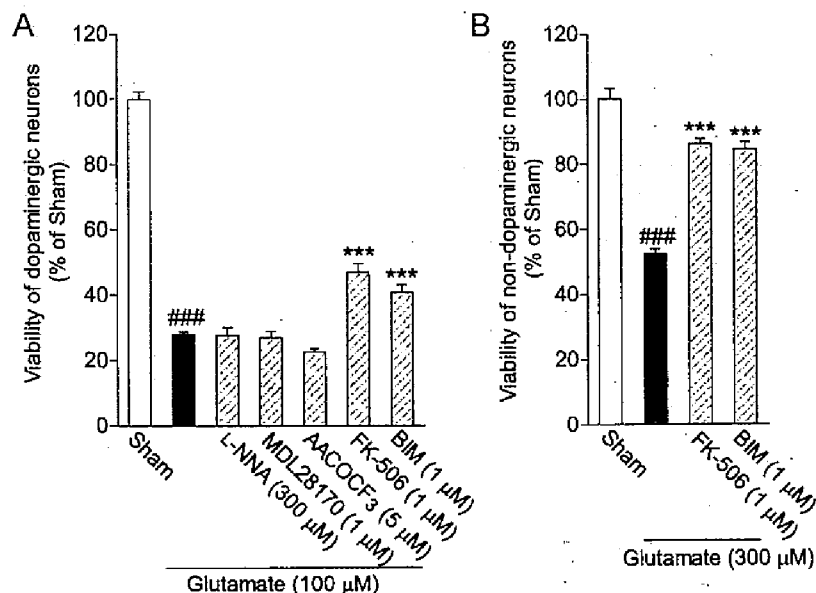


図1-24 グルタミン酸神経毒性に対するカルシウム依存性酵素阻害薬の作用

ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対するカルシウム依存性酵素阻害薬の影響。L-NNA (300 μ M)、MDL28170 (1 μ M)、AACOCF₃ (5 μ M)、FK-506 (1 μ M) または BIM (1 μ M)はグルタミン酸投与の1時間前から、グルタミン酸と同時に24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham, *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

また、グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死におけるROSの関与を検討したが、EUK-134 (10-30 μ M)は保護作用を示さなかった(図1-25A)。さらに、カスパーゼの関与も検討したが、カスパーゼ3特異的阻害薬z-DEVD-fmkおよび汎カスパーゼ阻害薬z-VAD-fmk (1-10 μ M)は保護作用を示さなかった(図1-25B)。

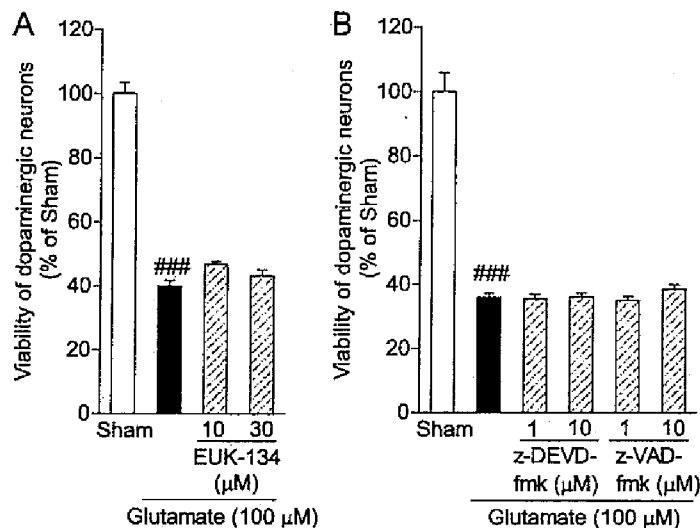


図1-25 グルタミン酸神経毒性に対するROS除去薬およびカスパーゼ阻害薬の作用
 ドパミンニューロンの生存率に対する EUK-134、z-DEVD-fmk および z-VAD-fmk の影響。EUK-134 (10-30 μM)、z-DEVD-fmk (1-10 μM) または z-VAD-fmk (1-10 μM)はグルタミン酸投与の1時間前から、グルタミン酸と同時に24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham.

グルタミン酸神経毒性におけるカリウムチャネルの関与

細胞内カリウムのホメオスタシスの破綻は細胞死を誘発することが知られており[30]、グルタミン酸神経毒性にカリウムチャネルが寄与するという報告がある[31]。そこで、中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対しカリウムチャネルの関与を検討した。非選択的なカリウムチャネルの阻害薬TEA (5 mM)およびキニジン(30 μM)により、ドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性は抑制された(図1-26A,B)。

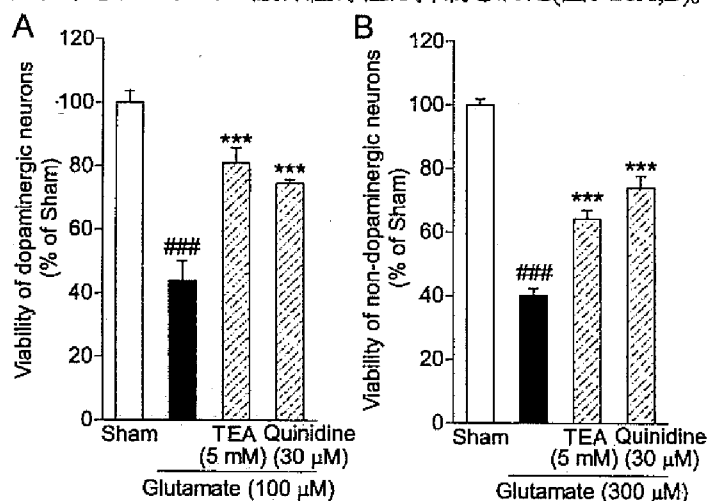
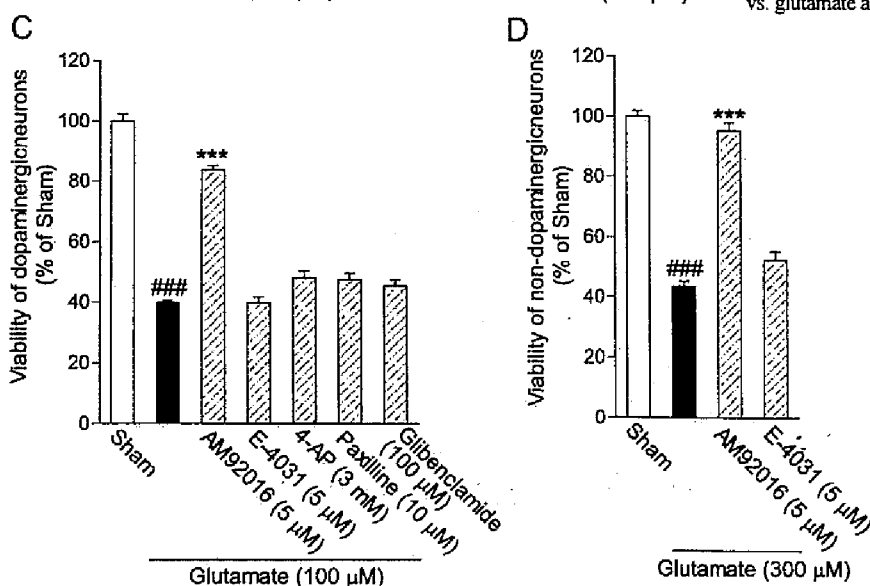


図1-26 グルタミン酸神経毒性に対するカリウムチャネル阻害薬の作用
 ドパミンニューロン(A,C)および非ドパミンニューロン(B,D)の生存率に対するカリウムチャネル阻害薬の影響。TEA (5 mM)、キニジン(30 μM)、AM92016 (5 μM)、E-4031 (5 μM)、4-AP (3 mM)、パキシリン(10 μM)またはグリベンクラミド(100 μM)はグルタミン酸投与の1時間前から、グルタミン酸と同時に24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham. *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.



グルタミン酸神経毒性に関与するカリウムチャネルのサブタイプを特定するために、より選択的なカリウムチャネル阻害薬を用いた。遅延整流性カリウムチャネル阻害薬AM92016 (5 μ M)によりグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死は顕著に抑制されたが、急速活性型選択的な遅延整流性カリウムチャネル阻害薬E-4031 (5 μ M)は保護作用を示さなかった。また、一過性外向型カリウムチャネル阻害薬4-AP (3 mM)、高コンダクタンスのカルシウム依存性カリウムチャネル阻害薬パキシリン(10 μ M)およびATP感受性カリウムチャネル阻害薬グリベンクラミド(100 μ M)によりグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死は影響を受けなかった(図1-26C)。非ドパミンニューロンに対する毒性もまたAM92016により抑制されたが、E-4031には影響を受けなかった(図1-26D)。なお、小コンダクタンスのカルシウム依存性カリウムチャネル阻害薬デカリニウム(1 μ M)は毒性を示した(データ省略)。

グルタミン酸神経毒性におけるmitogen-activated protein kinase (MAPK)経路の関与

NMDA 受容体刺激は、MAPK スーパーファミリーなどのシグナル分子と連関して興奮性シグナルを神経細胞に伝達する[32,33]。またグルタミン酸受容体を介した興奮毒性には MAPK 経路の関与が報告されている[34,35,36]。MAPK スーパーファミリーには大きく3つのサブファミリーが存在し、それぞれ extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK (p38)として知られている。それぞれの特異的な阻害薬により中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性への関与を検討した。ERK の上流に存在する MEK の阻害薬 PD98059 (PD)および p38 阻害薬SB203580 (SB)はドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンの両方に対し保護作用を示したが、JNK 阻害薬である SP600125 (SP)はドパミンニューロンにのみ保護作用を示した(図 1-27A,B)。

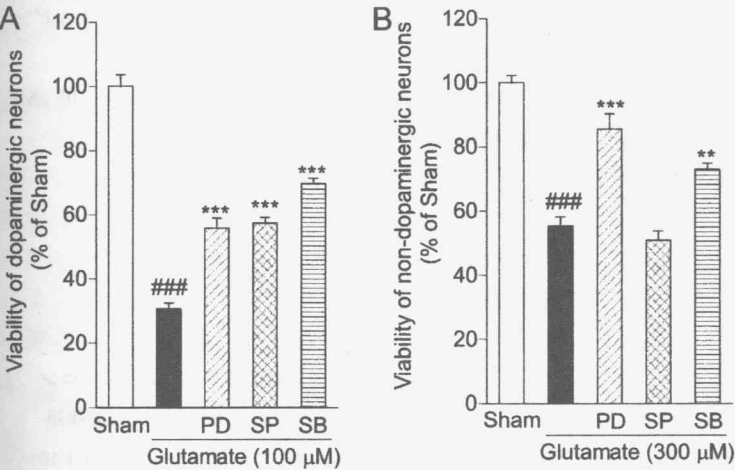


図1-27 グルタミン酸神経毒性に対する MAPK阻害薬の作用
ドパミンニューロン(A)および非ドパミンニューロン(B)の生存率に対する MAPK 阻害薬の影響。PD (30 μ M)、SP (30 μ M)またはSB (30 μ M)はグルタミン酸投与の1時間前から、グルタミン酸と同時に24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. sham. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

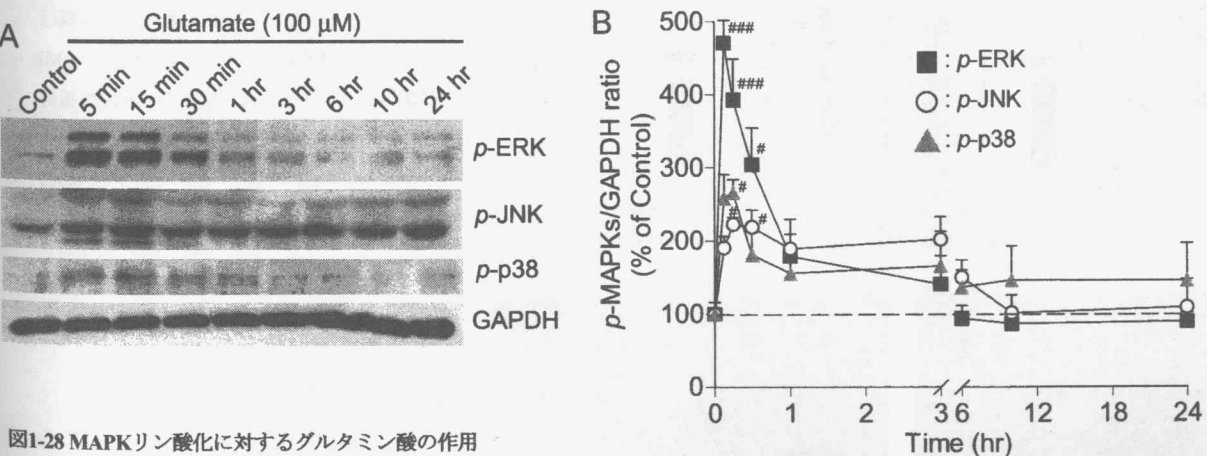


図1-28 MAPKリン酸化に対するグルタミン酸の作用
(A)グルタミン酸(100 μ M)を示した時間投与した後のリン酸化 MAPK および GAPDH のウェスタンプロテイング像。(B) MAPK リン酸化のタイムコース。リン酸化 MAPK の GAPDH に対する割合をコントロール(sham 処置 15 分後)での値を 100%として相対的に示している。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. control (time 0).

グルタミン酸(100 μ M)によるMAPK経路活性化の経時変化を調べる目的で、活性化型であるそれぞれのリン酸化タンパクをウェスタンブローディングにより検出した。中脳初代培養細胞にグルタミン酸(100 μ M)を投与したところ、いずれのMAPK経路も投与5-30分間に一過性に活性化されていた(図1-28A,B)。

グルタミン酸神経毒性における内在性ドパミンの関与

グルタミン酸神経毒性に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性のドパミンが関与するか検討するために、 α -MTまたはレセルピンにより細胞内ドパミンを枯渇させた。中脳初代培養細胞に α -MT (0.1-1 mM)またはレセルピン(0.1-10 μ M)を24時間投与したところ、ドパミン含有量は濃度依存的に減少した(図1-29A,B)。 α -MT(0.1-1 mM)またはレセルピン(0.1-10 μ M)を24時間前投与した後、さらにグルタミン酸と α -MTまたはレセルピンを同時に24時間投与したところ、ドパミンニューロンの生存率は濃度依存的に回復した(図1-30A,B)。図1-30C-Eにその典型写真を示す。

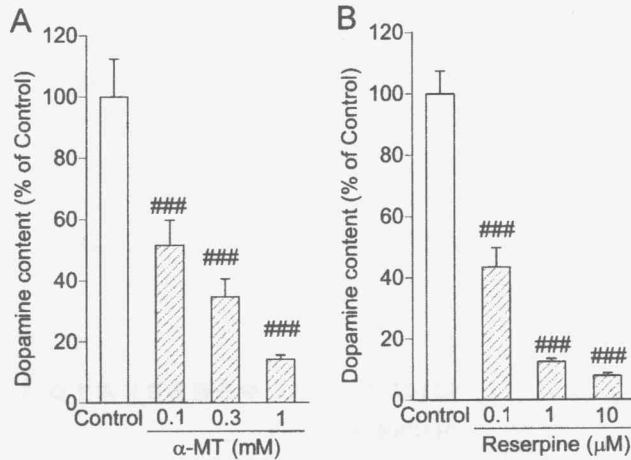


図 1-29 ドパミン含有量に対する α -MT およびレセルピンの作用

培養細胞を α -MT(0.1-1 mM)またはレセルピン(0.1-10 μ M)で24時間処置した。### $P < 0.001$ vs. control.

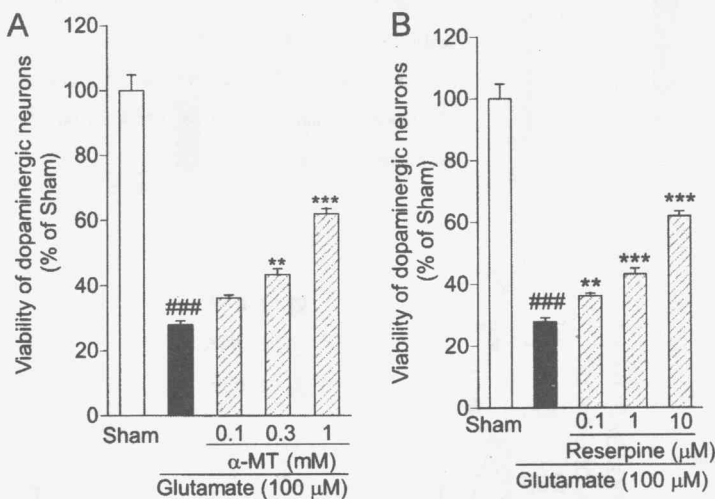
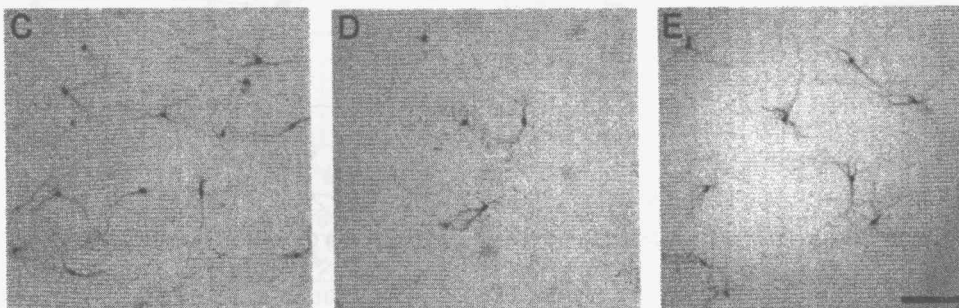


図 1-30 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対する α -MT およびレセルピンの保護作用

α -MT(0.1-1 mM; A) またはレセルピン(0.1-10 μ M; B)はグルタミン酸曝露前24時間からと、グルタミン酸と同時に24時間処置した。写真は各々、sham 処置群(C)、グルタミン酸(100 μ M)処置群(D)、グルタミン酸+ α -MT (1 mM)処置群(E)である。スケールバーは200 μ mを示す。### $P < 0.001$ vs. sham. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.



グルタミン酸によるTHリン酸化への影響

ドパミンニューロンにおける内在性ドパミンの動態はグルタミン酸により影響を受ける。例えば、NMDA受容体刺激はTHの19番目のセリン(Ser19)におけるリン酸化を促進する報告されている[37]。そこで中脳初代培養細胞におけるTHリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。グルタミン酸(100 μ M)投与によりTHのSer19およびSer31におけるリン酸化は一過性に増加したが、Ser40のリン酸化は影響を与えなかった(図1-31A,B)。

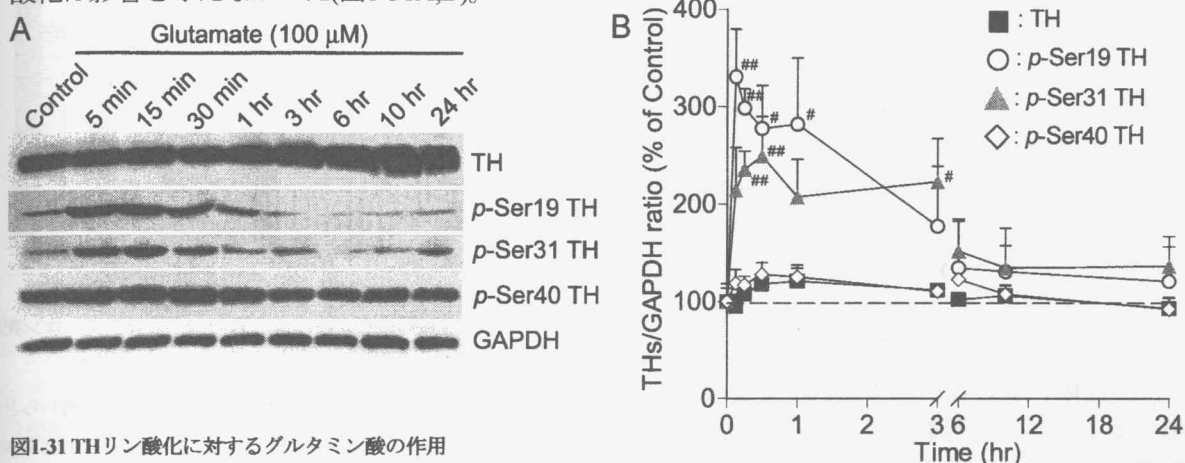


図1-31 THリン酸化に対するグルタミン酸の作用

(A)グルタミン酸(100 μ M)を示した時間投与した後のTH、リン酸化TH(p-Ser TH)およびGAPDHのウェスタンブロッティング像。(B)THリン酸化のタイムコース。リン酸化THのGAPDHに対する割合をコントロール(sham 処置 15 分後)での値を100%として相対的に示している。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. control (time 0)。

グルタミン酸によるドパミン遊離および含有量への影響

ドパミン遊離もまたグルタミン酸により調節されていることが知られている[38]。中脳初代培養細胞にグルタミン酸(30-300 μ M)を曝露するとドパミン遊離が増加した。100 μ Mのグルタミン酸で最も顕著なドパミン遊離が認められた。KCl (60 mM)刺激はポジティブコントロールとして用いた(図1-32A)。またグルタミン酸誘発ドパミン遊離はMK-801 (10 μ M)により抑制された(図1-32B)。一方、ドパミン含有量自体はグルタミン酸(100 μ M)曝露により変化しなかったため(図1-32C)、ドパミン合成が亢進している可能性がある。

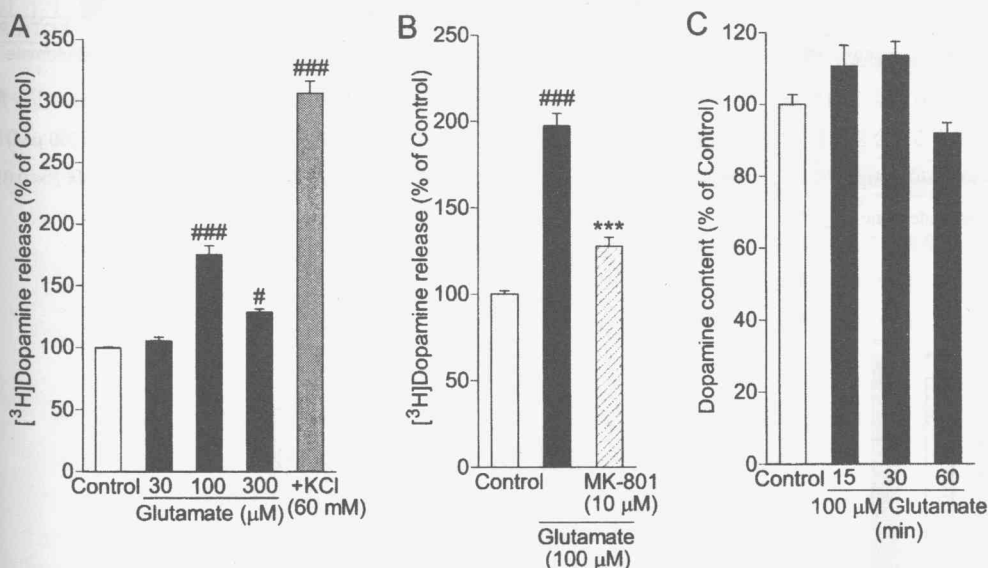


図1-32 ドパミン遊離(A-B)および含有量(C)に対するグルタミン酸の作用

(A) [3 H]ドパミンを細胞に取り込ませた後、グルタミン酸(30-300 μ M)またはKCl (60 mM)を30分間投与した。(B) MK-801 (10 μ M)をグルタミン酸曝露前15分前からとグルタミン酸(100 μ M)と同時に30分間投与した。(C) グルタミン酸(100 μ M)を15-60分間投与した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. control. *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

グルタミン酸神経毒性におけるMAPK経路と内在性ドパミンの相互作用

グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死にはMAPK経路および内在性ドパミンの関与が示された。この二つの要因の関連を明らかにするために、 α -MTにより細胞内ドパミンを枯渇させた条件でMAPK阻害薬の作用を検討した。PD98059は α -MTによる保護作用に対し相加的な作用を示さなかったが、SP600125およびSB203580は α -MTに対し相加的でありグルタミン酸神経毒性をほぼ完全に抑制した(図1-33)。したがって、グルタミン酸によるERK経路の活性化は内在性ドパミンを介して細胞毒性を発現していると考えられる。

そこで、まず、THリン酸化におけるERK経路の関与を検討した。ERKのリン酸化と対応してSer31のリン酸化はEGTA(2 mM)およびPD98059 (30 μ M)により抑制された。しかし、Ser19のリン酸化はEGTAにより抑制されたもののPD98059によっては影響を受けなかった(図1-34A-D)。次に、ドパミン遊離におけるERK経路の関与を検討した。グルタミン酸によるドパミン遊離の増加は、EGTA (2 mM)により完全に抑制されたが、PD98059 (30 μ M)および α -MT (1 mM)により部分的に抑制された(図1-35)。

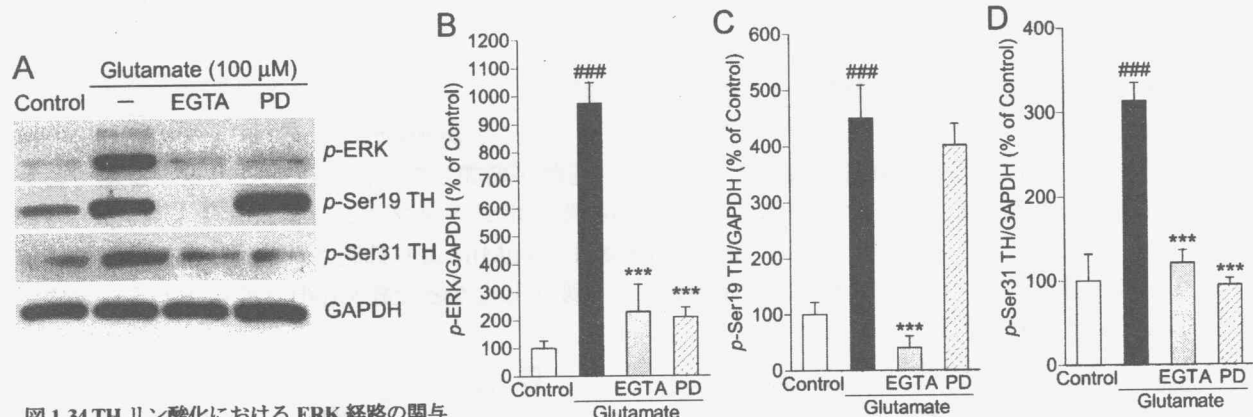


図 1-34 TH リン酸化における ERK 経路の関与

(A)リン酸化 ERK、リン酸化 TH および GAPDH のウェスタンブローディング像。リン酸化 ERK(B)、リン酸化 Ser19 TH(C)およびリン酸化 Ser31 TH(D)の GAPDH に対する割合をコントロールの値を 100%として相対的に示している。EGTA (2 mM)はグルタミン酸(100 μ M)と同時に 15 分間処置し、PD98059 (30 μ M)はグルタミン酸曝露前 1 時間前からとグルタミン酸(100 μ M)と同時に 15 分間処置した。### $P < 0.01$ vs. control. *** $P < 0.001$ vs. glutamate alone.

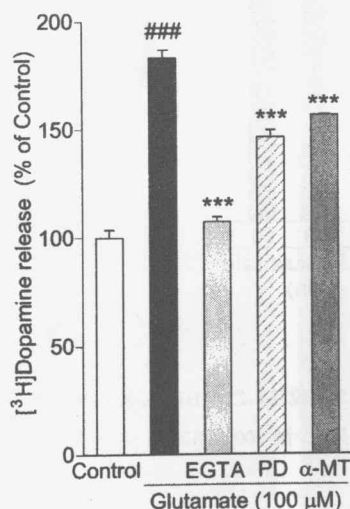


図 1-35 ドパミン遊離における ERK 経路の関与

[³H]ドパミンを細胞に取り込ませた後、EGTA (2 mM)はグルタミン酸(100 μ M)と同時に、PD98059 (30 μ M) および α -MT(1 mM)はグルタミン酸曝露前 15 分間からとグルタミン酸 (100 μ M)と同時に 30 分間処置した。### $P < 0.01$ vs. control. *** $P < 0.001$ vs. glutamate

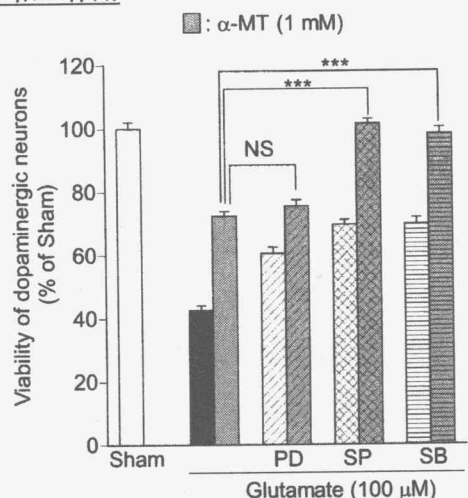


図 1-33 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対する α -MTと MAPK 阻害薬の相加作用

α -MT(1 mM)はグルタミン酸曝露前 24 時間前からとグルタミン酸と同時に、MAPK 阻害薬(30 μ M)はグルタミン酸曝露 1 時間前からとグルタミン酸と同時に 24 時間処置した。*** $P < 0.001$, NS; not significant.

考察

ロテノンは、ミトコンドリア複合体I阻害作用によるATPの欠乏、スーパーオキシドの過剰産生、ミクログリアのNADPH酸化酵素の活性化を誘発し、細胞毒性を発現すると考えられている[20,39,40]。高濃度ロテノンの24時間投与により惹起される毒性は、ドパミンニューロン、非ドパミンニューロンのいずれにおいてもMn-TBAPにより抑制されたことから、スーパーオキシドの過剰産生が中心的な役割を担っていることが示唆された。しかし、高濃度ロテノン毒性に対し、ドパミンニューロンは非ドパミンニューロンに比べ抵抗性を示した。ドパミンニューロンは非ドパミンニューロンよりCu/Zn-SODのmRNAレベルが高いこと[41]、および不死化ドパミンニューロン株MN9D細胞は不死化非ドパミンニューロン株MN9X細胞よりグルタチオン含有量が多いことが報告されている[42]。したがって、ドパミンニューロンに豊富に存在するSODやグルタチオンが、スーパーオキシドの過剰産生を伴う急性のロテノン毒性に対して抵抗性を獲得する一因であることが推測される。

一方、低濃度ロテノンを5日間投与すると、ドパミンニューロンにのみ有意な生存率の低下が認められ、ロテノン誘発神経毒性に対する感受性が逆転した。10 nMという低濃度のロテノンによる複合体I阻害は20%程度に過ぎず、ATP産生にはほとんど影響を与えないが[20]、時間依存的に細胞内スーパーオキシドを増加させることが報告されている[21]。低濃度ロテノンでは非ドパミンニューロンの生存率は低下しなかったことから、スーパーオキシド生成量は非ドパミンニューロンの比較的脆弱な抗酸化システムでも致命的にはならない程度であったと推測される。しかし、 α -MTの適用により細胞内ドパミン含有量が低下した条件で低濃度ロテノンによるドパミンニューロン選択的な神経毒性が抑制されたことを考え合わせると、単独では毒性を発現しない程度のスーパーオキシドが内在性ドパミンに作用している可能性がある。スーパーオキシドはドパミンの自動酸化を促進し、過酸化水素を発生させ、ドパミン酸化中間体を生成させると考えられている[43]。ドパミン酸化中間体はタンパクのシステイン残基やDNAと共有結合することや[44,45]、Lewy小体の主要成分である α -synucleinを毒性の強いプロトフィブリル型に安定化すること[46]によりドパミンニューロン選択的な細胞死を誘発する可能性が指摘されている。

以上をまとめると、低濃度ロテノンの曝露では、複合体Iの部分的な阻害により発生したスーパーオキシドがドパミン酸化を促進し細胞毒性を発現することが示唆された。本研究により想定される低濃度ロテノン誘発ドパミンニューロン死の機序を図1-36に示す。

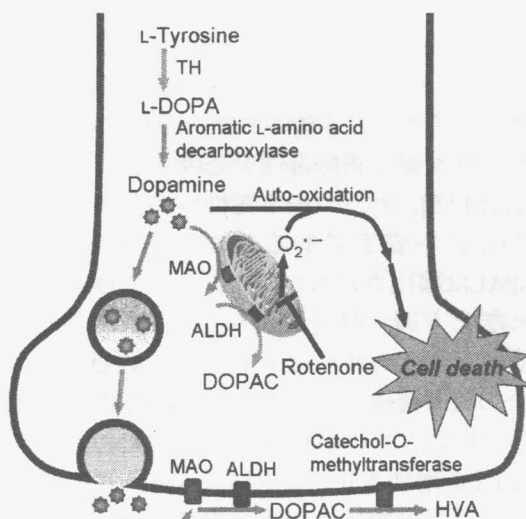


図1-36 低濃度ロテノン誘発ドパミンニューロン死の機序

- 生理的条件下における内在性ドパミンの動態
- 低濃度ロテノンにより誘導される経路

*In vivo*におけるパラコートの全身投与は、黒質GABA作動性ニューロンや様々な傷害に脆弱であることが知られている海馬ニューロンには影響を与えず、黒質ドパミンニューロンを選択的に脱落させることが報告されている[9,47]。このことは、ドパミンニューロンがパラコート毒性に対し特に感受性が高いことを示唆している。本研究において、ドパミンを含有するPC12細胞は、含有しないSH-SY5Y細胞に比べ、パラコート毒性に対し脆弱であった。さらに、 α -MTおよびレセルピンの適用により細胞内ドパミンが枯渇した条件下でパラコート誘発PC12細胞死が抑制されたことより、内在性ドパミンがパラコート毒性に関与していることが示唆される。*In vivo*におけるパラコートの投与は、直後に線条体ドパミンレベルを一過性に増加させ[48]、その後、ドパミンニューロンが脱落するにも関わらず、線条体ドパミン含有量を減少させないこと[9,49]、また、一部のドパミン代謝物を増加さ

せること[50]が報告されている。さらに、パラコートは興奮性シグナルを介してドパミン遊離を持続的に亢進させることが報告されている[51]。これらの知見は、パラコートがドパミンニューロンの神経化学的性質に影響を与えていることを示唆している。本研究において、パラコートに曝露されたPC12細胞の細胞内ドパミンは投与9-12時間後に約2.5倍まで増加した。以上をまとめると、パラコートによるドパミン含有量の増加が、パラコートに対するドパミンニューロンの脆弱性に寄与することが示唆される。

ドパミン含有量の増加は生合成の亢進による可能性がある。パラコートを投与されたマウスではTH活性が増大することが報告されており、ドパミンニューロン脱落による線条体ドパミン量減少を防ぐ代償的な作用であると考えられている[9,49]。しかし、本研究において、パラコートはTHリン酸化およびその活性に影響を与えなかったことから、*in vitro*ではそのような代償作用は機能しないことが示唆される。細胞外でのドパミン濃度の変化を検討したところ、通常の培養条件では数時間後にはプラトーに達し、ドパミンの遊離が再取込および代謝と平衡状態にあることが推測される。しかし、パラコート投与により細胞外ドパミン濃度は増加し続けた。 $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの遊離および細胞内取込はパラコートにより影響を受けなかったことから、遊離および取込の機能自体に影響を及ぼさないことが示唆される。また、パラコート投与により細胞外DOPAC濃度は低下したが、細胞外HVA濃度にはほとんど影響を及ぼさなかったことから、ドパミンからDOPACへの変換が減少している可能性がある。

ドパミンは、MAOによりDOPALに変換された後、ALDHによりDOPACを生成する[26]。細胞内でのドパミンからDOPACへの変換は主にミトコンドリアにおいて行われる。細胞内パラコートはミトコンドリア画分においてMAO活性には影響を与えずALDH活性を抑制した。ALDHのサブタイプのうちミトコンドリアに局在するALDH-2はジスルフィラム感受性であり[52]、ジスルフィラムによりパラコート毒性が増強された。したがって、少なくとも一つには、パラコートによるALDH活性低下が毒性発現に寄与することが示唆された。DOPALは非常に不安定で反応性が高く細胞毒性を発現することが知られており[53,54,55]、パラコート毒性への寄与も考えられる。しかし、不安定であるためか、本実験条件下ではDOPALは検出されなかった。また、DOPALの一部は、アルデヒド還元酵素により3,4-ジヒドロキシフェニルエタノール(DOPET)に分解され、ALDHが阻害された場合の代償機構となることが知られており[56]、ジスルフィラムによるALDH阻害はDOPALよりむしろDOPETを増加させること[55]が報告されている。細胞内ドパミンは複雑に調節されているため、必ずしもパラコートによるドパミン含有量の増加の機序を解明できなかったが、ALDH活性の部分的な低下が関与していることが示唆された。本研究により想定されるパラコート誘発ドパミンニューロン死の機序を図1-37に示す。

パラコートのようなイオン化分子は容易に脳血管関門や細胞膜を透過しない。以前の報告では、パラコートは中性アミノ酸輸送体により脳内に取り込まれることが示されている[57]。ドパミンニューロンへの取込には、MPP⁺と同様にDATの関与が推測されているが、十分には証明されていない。パラコートは線条体においてDATに結合すること[49]、線条体へのパラコートの蓄積の一部はナトリウム依存性でGBR12909により抑制されること[57,58]、パラコート毒性がGBR12909により抑制されること[58]が報告されている。一方、パラコート毒性はDATの発現に依存しないこと、および本研究結果と同様に $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの細胞内取込をパラコートは抑制しないことが示されている[4]。さらに、Barlowらは、パラコートがDATとは異なる機序で能動的に輸送されることを示唆している[60]。これらのことを考慮すると、パラコートに対するドパミンニューロンの脆弱性の一つの理由として、選択

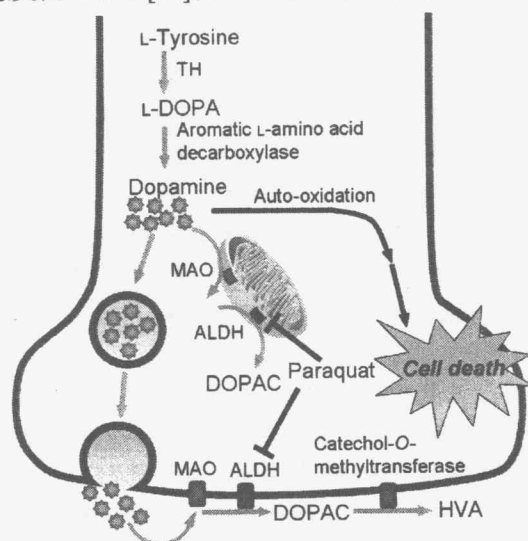


図 1-37 パラコート誘発ドパミンニューロン死の機序
 → 生理的条件下における内在性ドパミンの動態
 → パラコートにより誘導される経路

的な取込機構を必ずしも除外できない。

パラコートが細胞に傷害を与える機序として、酸化還元サイクルを介したスーパーオキシド産生の増大が考えられている。ジアフォラーゼもしくはNADPH酸化酵素はNADPH依存的にパラコートの電子還元を触媒する。生成したパラコートラジカルは酸素分子にその電子を転移しスーパーオキシドを発生させ、自身は再びパラコートに戻る[61]。しかし、本研究において、PC12細胞に対するパラコート毒性はMn-TBAPおよびEUK-134により抑制されなかったことから、本実験条件下で生成したスーパーオキシドはPC12細胞にとって致命的にはならなかったと考えられる。

以上をまとめると、パラコートはドパミン含有量を増加させることが明らかになり、過剰に蓄積した細胞内ドパミンがパラコートに対するドパミンニューロンの脆弱性に寄与している可能性がある。

過去の報告や著者らのグループによる以前の研究において、中脳初代培養細胞に対し高濃度のグルタミン酸を10分間投与することで惹起される神経細胞死はドパミンニューロン選択的ではなかった[62,63]。一方、脊髄初代培養細胞において、選択的な運動ニューロン死が、高濃度グルタミン酸10分間曝露では起こらないが、低濃度24時間曝露により惹起されることが報告されている[64]。大脳皮質初代培養細胞においてもグルタミン酸の高濃度10分間処置と低濃度24時間処置では細胞死を発現する機序が異なることが示唆されている[65]。そこで、本研究では、中脳初代培養細胞に低濃度グルタミン酸24時間投与し、グルタミン酸神経毒性に対するドパミンニューロンの脆弱性について検討した。

グルタミン酸24時間投与すると、ドパミンニューロンでは100 μ Mから細胞死が惹起されたが、非ドパミンニューロンでは300 μ M以上の濃度が細胞毒性発現に必要であった。グルタミン酸の24時間曝露では、ドパミンニューロンはグルタミン酸神経毒性に対し脆弱であり、しかも、100 μ Mでは選択的ドパミンニューロン死が惹起されることが明らかとなった。ドパミンニューロンが脆弱である理由を明らかにするため、ドパミンニューロンと非ドパミンニューロンでのグルタミン酸神経毒性の相違について検討した。いずれのニューロンにおいても、NMDA受容体を介したカルシウム流入が細胞毒性の引き金であった。細胞内カルシウム濃度の上昇は、種々のカルシウム依存性酵素を活性化することが知られている。NOSおよびホスホリパーゼA₂は酸化ストレスを惹起し細胞死を誘発する[66]。カルパインはカテプシンまたはカスパーゼ12を活性化し、ネクローシスまたはアポトーシスを誘発する[67]。しかし、中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死はNOS阻害薬L-NNA、カルパイン阻害薬MDL28170、ホスホリパーゼA₂阻害薬AACOCF₃により抑制されなかったことから、NOS、ホスホリパーゼA₂およびカルパインの寄与は小さいことが示唆された。一方、中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性はカルシニューリン阻害薬FK-506およびPKC阻害薬BIMにより抑制されたことから、カルシニューリンおよびPKCの活性化が重要な役割を果たすことが示された。カルシニューリンの阻害はNOSの抑制や神経栄養因子の発現誘導などにより神経保護作用を示すと考えられている[68]。また、PKCは、NMDA受容体刺激により活性化され核内移行することやERKのリン酸化を介してグルタミン酸神経毒性に寄与することが報告されている[69,70]。しかし、カルシニューリンおよびPKCの関与はドパミンニューロンと非ドパミンニューロンのいずれにおいても認められ、脆弱性を決定する要因ではないように思える。

血清除去やスタウロsporinはカリウムチャネルからの外向きカリウム流出を持続させアポトーシスを誘発することや細胞内カリウム濃度低下がヌクレアーゼやカスパーゼを活性化することが報告されており[71,72]、細胞内カリウム恒常性の破綻は細胞死に密接に関わっている。虚血、低酸素誘発神経細胞傷害がカリウムチャネル阻害薬TEAにより抑制され、虚血後の海馬CA1領域でカリウム電流が増加していることが示された[73,74,75]。さらに、最近、海馬におけるグルタミン酸神経毒性がTEAにより抑制されることが報告された[31]。これらの報告は、グルタミン酸神経毒性においてカリウムチャネルが関与することを示唆している。中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性もまたTEAおよびキニジンにより顕著に抑制されたことから、カリウムチャネルの開口が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究において遅延整流性カリウム電流を抑制するAM92016が[76]、グルタミン酸神経毒性を抑制したことは、海馬ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の発現に遅延整流カリウム電流増加を伴うという過去の報告と一致する[31]。遅延整流性カリウム電流は急速活性

化型と緩徐活性化型に分けられ、急速活性化型に特異的な阻害薬E-4031では保護作用が認められなかったことから、緩徐活性化型の遅延整流性カリウムチャネルの関与が示唆される。緩徐活性化型遅延整流性カリウムチャネルを構成する主要なサブユニットであるKv2.1は、グルタミン酸刺激によりカリニューリンを介し脱リン酸化されることで、細胞内局在と遅延整流性カリウム電流を調節することが報告されている[77,78]。したがって、Kv2.1を含む電位依存性カリウムチャネルを介した持続的なカリウム流出が神経細胞死の重要なメディエーターであることが示唆される[79]。しかし、カリウムチャネルの関与もまたドパミンニューロンと非ドパミンニューロンのいずれにおいても認められ、脆弱性を決定する要因ではなかった。

グルタミン酸受容体刺激により駆動される細胞内情報伝達経路の一つに MAPK 経路が知られている[32]。ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸誘発細胞死には ERK、JNK および p38 のすべての MAPK 経路の関与が示唆されたが、非ドパミンニューロンでは ERK および p38 の関与のみ示された。グルタミン酸受容体刺激により活性化される MAPK 経路は報告により相違がある[34,35,36]。実験に用いられている培養細胞の由来が異なることを考えると、神経細胞の種類により異なる経路が活性化されることを意味するかもしれない。ERK の上流に存在する Ras は NMDA 受容体を構成するサブユニットのうち NR2B と直接結合するが、NR1 や NR2A とは相互作用しないことが報告されており、NMDA 受容体サブユニットの構成によりそれ以降のシグナル経路が異なる可能性がある[80]。ドパミンニューロンで非ドパミンニューロンとは異なる MAPK 経路が活性化される詳細な機序の解明には更なる研究が必要だが、細胞死への情報伝達経路の相違のためグルタミン酸神経毒性に対する感受性が異なることが示唆された。

α -MT およびレセルピンにより細胞内ドパミンを枯渇させるとグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死が抑制されたことは、グルタミン酸に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが関与していることを示唆している。グルタミン酸は、ドパミンニューロンにおいて内在性ドパミンの動態に影響を与えることが知られている。NMDA 受容体刺激は TH の Ser19 をリン酸化するが、Ser40 には影響を与えないことが報告されている[37]。本研究では Ser19 に加えて Ser31 もまたグルタミン酸によりリン酸化されることを示した。TH の主なリン酸化酵素として、Ser19 にはカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II、Ser31 には ERK、Ser40 にはプロテインキナーゼ A が挙げられる[81]。プロテインキナーゼ A による Ser40 のリン酸化は TH 活性を 10 倍増加させることが報告されており、ドパミン生合成に大きく寄与すると考えられている[82]。一方、Ser19 のリン酸化は直接 TH 活性を増加させないが、Ser40 のリン酸化が起こりやすいコンフォメーション変化を起こす[83]。さらに、Ser31 のリン酸化は TH 活性を 1.2-2 倍増加させることが報告されており[84,85,86]、グルタミン酸による TH の Ser19 および Ser31 のリン酸化は、ドパミン生合成を促進していることが示唆される。グルタミン酸はまた、ドパミン遊離を調節することが知られている[38]。過去の報告と一致して[87]、中脳初代培養細胞においてグルタミン酸は NMDA 受容体を介したカルシウム流入によりドパミン遊離を増加させた。ただし、300 μ M よりも 100 μ M のグルタミン酸によるドパミン遊離の方が顕著であった。代謝型グルタミン酸受容体の一部はドパミン遊離を抑制することが報告されており[88]、NMDA 受容体以外の複雑な調節機構が関与するかもしれない。また、ドパミン遊離が増加するのに対しドパミン含有量が減少しなかったことから、ドパミン生合成が亢進していることが示唆される。これらのことを踏まえると、グルタミン酸に曝露されたドパミンニューロンではドパミンの生合成と遊離といった神経活動が亢進

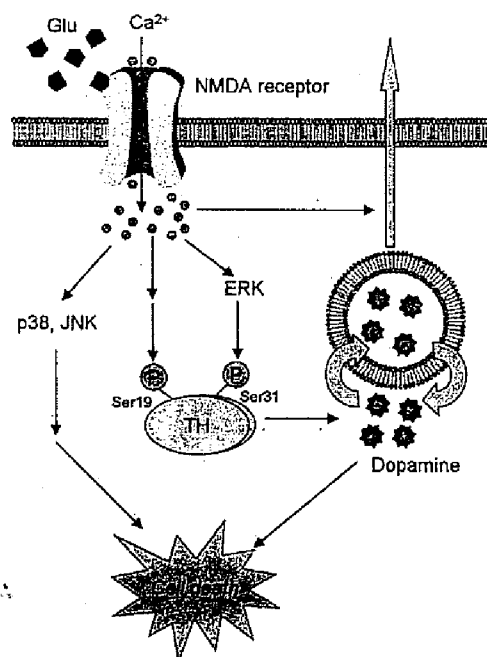


図 1-38 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死の機序

し、小胞外に存在するドパミンが増加していることが考えられる。

細胞内ドパミンを枯渇させた場合、SP600125 および SB203580 はグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死を完全に抑制した。したがって、ドパミンニューロンはグルタミン酸に曝露されると、内在性ドパミンを介する経路と JNK および p38 を介する経路が活性化され細胞死を惹起することが示唆される。一方、細胞内ドパミンを枯渇させた場合、PD98059 は相加的な保護作用を示さなかった。この結果は、ERK 経路の活性化は内在性ドパミンを介する経路に収束されることを示唆している。TH リン酸化に対する ERK 経路の関与を検討したところ、過去の報告と一致して[81]、Ser31 の TH リン酸化に寄与していることが明らかとなった。一方、ドパミン遊離に対しても一部 ERK 経路の関与が認められた。 α -MT もまた PD98059 と同程度グルタミン酸誘発ドパミン遊離を抑制したことを考え合わせると、ERK 経路を介した Ser31 の TH リン酸化によるドパミン生合成の増加が、ドパミンの遊離増加に寄与することが示唆される。

以上をまとめると、ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性に対するドパミンニューロンの脆弱性の一部には、生合成と遊離の亢進により小胞外に存在するドパミンの増加が関与していることが示唆された。本研究により想定されるグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死の機序を図1-38 に示す。

結論として、種々の細胞毒が誘発するドパミンニューロン死発現機序に内在性ドパミンが関与していることを示し、病態時にはドパミンニューロンにとって危険因子になりうることを明らかにした。本章の研究結果は、パーキンソン病における黒質ドパミンニューロンの脆弱性の解明に寄与するものである。

第二章

ドパミン誘発細胞死におけるドパミン酸化中間体の役割

パーキンソン病剖検脳において脂質の過酸化[89]やDNAの傷害[90]、タンパクのカルボニル化[91]が観察されることから、パーキンソン病の病態形成に酸化ストレスの関与が指摘されている[92]。第一章において選択的ドパミンニューロン死における内在性ドパミンの寄与を示したように、その酸化ストレスの主要な候補の一つとしてドパミンが挙げられる[93]。ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなどのカテコール基を有する生体アミンは、生理的なpHでは非常に不安定である。ドパミンは酸素分子により容易に酸化され、スーパーオキシドや過酸化水素などのROSを発生させ、自身は酸化中間体であるキノン体や環化したアミノクロムを経て最終生成物であるメラニンに変換する(図2-1)。パーキンソン病ではニューロメラニンを含むドパミンニューロンほど変性が進みやすいという報告があり、ドパミン酸化が細胞死と関連があることを示唆している[94]。ROSに加えて、ドパミン酸化中間体もまた反応性が高いため、これらの細胞傷害性も想定されている[95]。実際、高濃度のドパミンの曝露は*in vivo*および*in vitro*において細胞死を惹起するが[17,96]、ROSまたはドパミン酸化中間体の寄与の詳細について明らかにされていない。

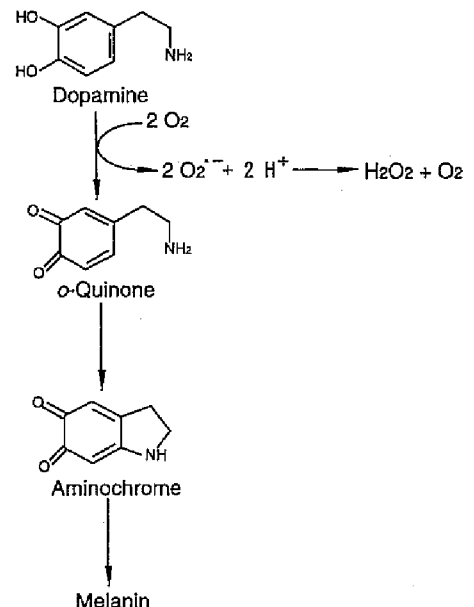


図 2-1 ドパミン自動酸化の過程

パーキンソン病患者の黒質緻密部において鉄が沈着していることが知られており[97]、鉄はフェントン反応を触媒しヒドロキシラジカルを発生させることから神経変性に寄与するものと考えられてきた。しかし、鉄の沈着は病状の進行した段階でしか観察されないこと[98]、また実験的にも、神経傷害が発生してから二次的に鉄の蓄積がおこることから[99]、その正確な役割については未だ解明されていない[100]。鉄などの金属イオンはカテコラミン酸化を促進することが報告されているが[101]、カテコラミン誘発細胞死に鉄がどのように作用するかについては検討されていない。

本章において、著者は、第一節においてドパミン誘発細胞死へのドパミン酸化中間体の関与を検討し、第二節において鉄のドパミン酸化中間体に対する作用およびドパミン毒性に与える影響を検討した。

実験方法

(1) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

N-アセチル-L-システイン(NAC)、L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO)、SODおよび硫酸第一鉄はSigmaより購入した。ドパミン、L-システイン(Cys)、キサンチンオキシダーゼ(XO)、カタラーゼおよび塩化第二鉄はナカライテスクより購入した。還元型グルタチオン(GSH)および過酸化水素は和光純薬工業より購入した。キサンチンは興人(Tokyo, Japan)より購入した。

(2) 株化細胞の調製と維持

第一章の実験方法(3)と同様の方法で行った。

(3) 株化細胞における細胞毒性の評価

第一章の実験方法(6)と同様の方法で行った。

(4) ドパミン酸化中間体の定量

ドパミン(300 μ M)を重炭酸緩衝液(100 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, pH 7.2)中で5%CO₂、37°Cの環境下インキュベートした。インキュベート後、10 μ lの反応液に90 μ lの抽出溶液を加え、サンプルとした。測定は、作用電極の電位を-200 mVに設定した以外は、第一章の実験方法(7)と同様の方法で行った。

(5) メラニン生成の測定

ドパミン(300 μ M)を10%FCS添加DMEM中で5%CO₂、37°Cの環境下一定時間インキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートリーダーで吸光度(405 nm)を測定した。バックグラウンドとして10%FCS添加DMEMの吸光度(405 nm)を引き、差分をメラニン生成量とした。

(6) 過酸化水素の定量

ドパミン酸化の過程で生成した過酸化水素は、Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit (Molecular Probes)を用いて測定した。ドパミン(300 μ M)を重炭酸緩衝液中で5%CO₂、37°Cの環境下インキュベートした。インキュベート後、反応液と等量の作用液(100 μ M Amplex red, 0.2 U/ml HRP)を加え、室温で30分間反応させた。反応により生成したレゾルフィンの蛍光強度を励起波長544 nm、蛍光波長590 nmで蛍光測定器(FLEXstation)を用いて測定した。

(7) 統計処理

第一章の実験方法(13)と同様の方法で行った。

実験結果

第一節 ドパミン誘発細胞死に関与する因子

ドパミン誘発細胞死に対する抗酸化薬の作用

ドパミンが細胞死を惹起する機序について、SH-SY5Y細胞を用いて検討した。未分化のSH-SY5Y細胞はTHを発現していないため内因性カテコラミンは存在しなかった(図1-8B)。そこで、SH-SY5Y細胞に外来性にドパミン(30-1000 μ M)を24時間曝露すると、濃度依存的に生存率が減少した(図2-2A)。以降の実験では300 μ Mのドパミンを用いた。抗チオール酸化薬であるGSH、NACおよびCys (0.3-3 mM)をドパミンと同時に投与したところ、濃度依存的な保護作用を示した(図2-2B)。また、グルタチオン合成酵素阻害薬BSO (1-10 μ M)を同時適用したところ、ドパミン毒性に対し増悪作用を示した(図2-2C)。SOD (10-100 U/ml)はドパミン毒性を濃度依存的に抑制したが(図2-2D)、過酸化水素除去酵素カタラーゼ(10-100 U/ml)のドパミン毒性に対する保護作用は限定的であった(図2-2E)。

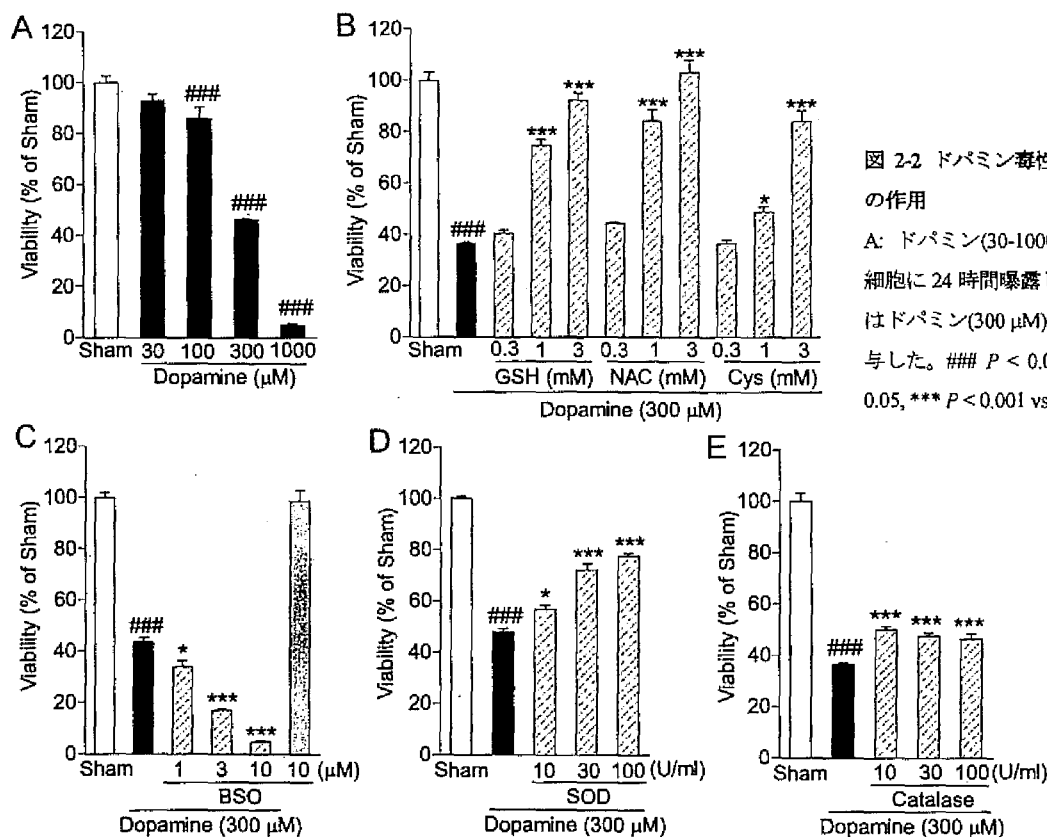


図 2-2 ドパミン毒性に対する抗酸化薬の作用

A: ドパミン(30-1000 μ M)を SH-SY5Y 細胞に 24 時間曝露した。(B-E) 各薬物はドパミン(300 μ M)と同時に 24 時間投与した。### $P < 0.001$ vs. sham. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. dopamine alone.

ROS誘発細胞死に対する抗酸化薬の作用

次に、スーパーオキシドおよび過酸化水素誘発毒性に対する抗酸化薬の作用を検討した。スーパーオキシド供与体であるキサンチン/キサンチンオキシダーゼおよび過酸化水素誘発細胞死に対して、カタラーゼ(10-100 U/ml)はほぼ完全に抑制した(図2-3A)。抗チオール酸化薬であるGSH、NAC、Cysもまた、過酸化水素毒性に対し保護作用を示した(図2-3B)。

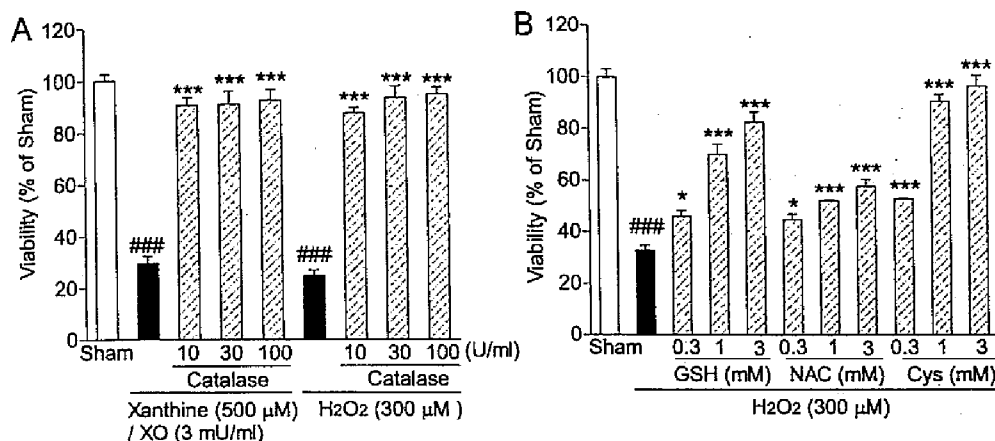


図 2-3 ROS 誘発細胞死に対する抗酸化薬の作用

A: キサンチン(500 μM)/キサンチンオキシダーゼ(XO; 3 mU/ml)または過酸化水素(300 μM)と同時にカタラーゼ(10-100 U/ml)を 24 時間投与した。B: 過酸化水素(300 μM)と同時に GSH、NAC、Cys (0.3-3 mM)を 24 時間投与した。### $P < 0.001$ vs. sham. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. toxin alone.

ドパミン酸化中間体に対する抗酸化薬の作用

ドパミン自動酸化の過程で生成する α -キノンおよびアミノクロームに対する抗酸化薬の影響を検討した。ドパミン(300 μM)を1時間自動酸化させると、 α -キノン(保持時間: 3.8 min)およびアミノクローム(7.3 min)のピークがHPLCにおいて観察された(図2-4A)。GSH、NACまたはCysの存在下ドパミンを酸化させると、いずれのドパミン酸化中間体も検出されなかった。カタラーゼ存在下ではドパミン酸化中間体生成量に変化はなかったが、SOD存在下では α -キノンの生成量が有意に減少した(図2-4B,C)。次に、ドパミン(300 μM)を1時間自動酸化させドパミン酸化中間体を生成させた後、GSH、NACまたはCysを添加するとアミノクローム量に大きな変化はなかったが、 α -キノン量は顕著に減少した。一方、SODの添加はいずれのドパミン酸化中間体量にも影響を与えなかった(図2-4D,E)。

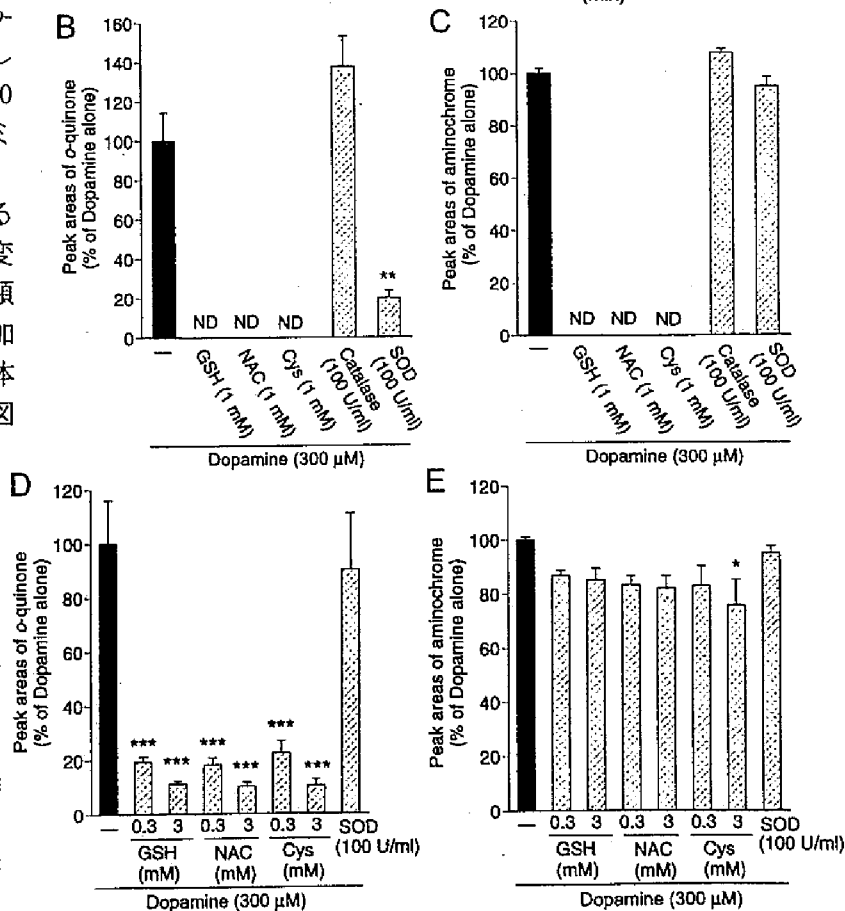
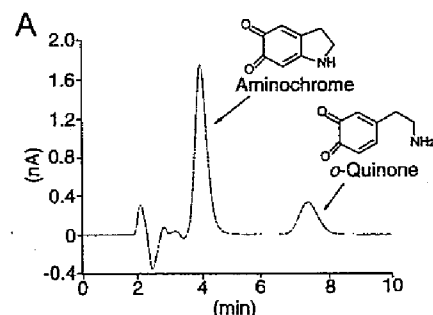


図 2-4 ドパミン酸化中間体に対する抗酸化薬の作用

A: ドパミン(300 μM)を1時間自動酸化させた後の HPLC チャート。B-C: 抗酸化薬存在下ドパミンを酸化させた後の α -キノン(B)およびアミノクローム(C)量。D-E: ドパミンを自動酸化させた後、抗酸化薬を添加した時の α -キノン(D)およびアミノクローム(E)量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. dopamine alone. ND; not detected.

第二節 ドパミン自動酸化およびドパミン毒性に対する鉄イオンの作用

ドパミン酸化中間体に対する鉄イオンの作用

鉄イオンがドパミン自動酸化に与える影響について検討した。二価鉄(1 mM)存在下または非存在下でドパミン(300 μ M)を酸化し、一定時間ごとに o -キノンおよびアミノクローム量を測定した(図2-5A,C)。 o -キノンおよびアミノクローム量を曲線下面積より算出すると、二価鉄によりそれぞれ約64および45%にまで減少した(図2-5B,D)。

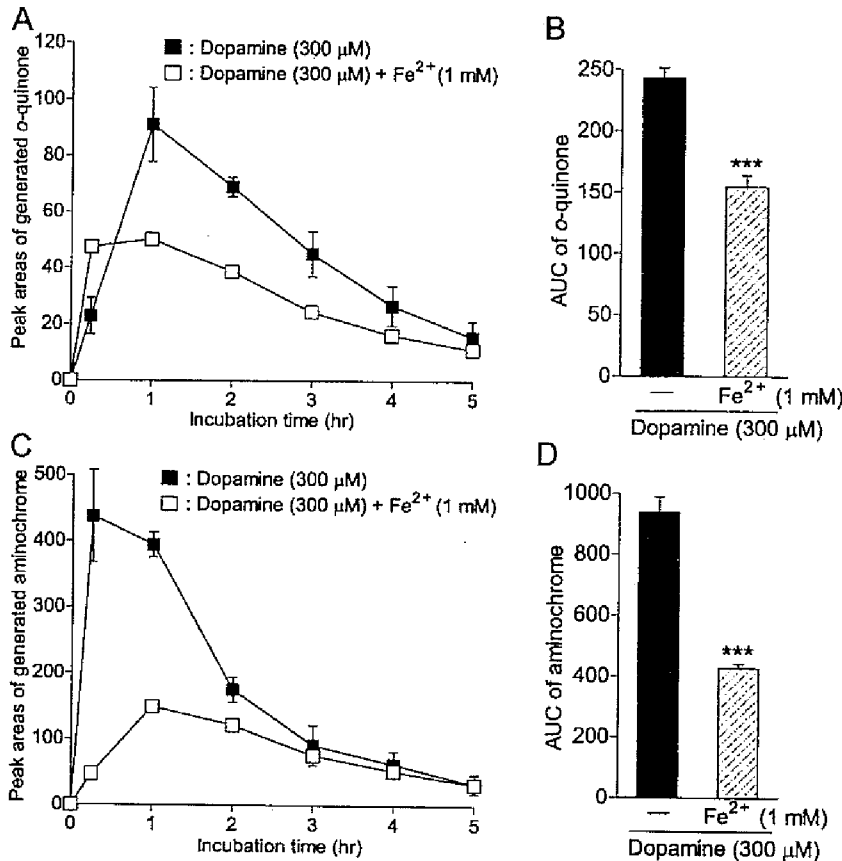


図 2-5 ドパミン酸化中間体に対する二価鉄の作用

A,C: o -キノン(A)およびアミノクローム(C)量の経時変化。二価鉄(1 mM)存在下ドパミン(300 μ M)を示した時間だけ酸化させた。B,D: o -キノン(B)およびアミノクローム(D)量の曲線下面積(AUC)。AUCは台形法により算出した。*** $P < 0.001$ vs. dopamine alone.

メラニン生成に対する鉄イオンの作用

次に、ドパミン酸化の最終生成物であるメラニンの生成量に対する鉄イオンの作用について検討した。ドパミン(300 μ M)を自動酸化させると、時間依存的にメラニン量は増加し、二価鉄または三価鉄(300 μ M)存在下では1-24 時間後において有意に上昇した(図 2-6)。

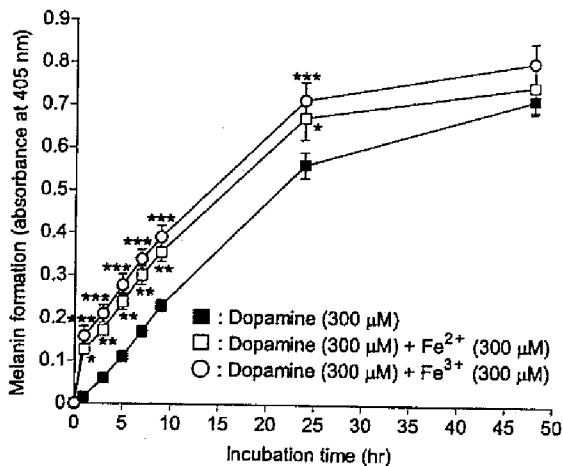


図 2-6 メラニン生成に対する鉄イオンの作用

鉄イオン存在下または非存在下でのメラニン生成量の経時変化。二価鉄または三価鉄(300 μ M)存在下ドパミン(300 μ M)を示した時間だけ酸化させた。有意差検定は二元配置分散分析法後の Bonferroni test により評価した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. dopamine alone.

ドパミン酸化に伴う過酸化水素生成に対する鉄イオンの作用

ドパミンの自動酸化過程で生成する活性酸素種に対する鉄イオンの作用について検討した。ドパミン(300 μ M)を自動酸化させると、過酸化水素が時間依存的に増加し、3日後にはおよそ50 μ Mでプラトーに達した(図2-7A)。二価鉄または三価鉄(10-100 μ M)存在下、ドパミン(300 μ M)を24時間酸化させると生成する過酸化水素は濃度依存的に減少した(図2-7B)。

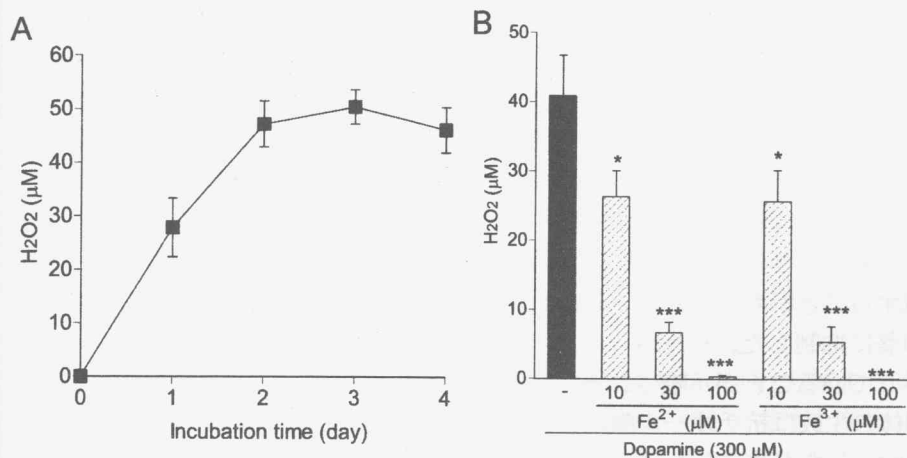


図 2-7 過酸化水素生成に対する鉄イオンの作用

A: 過酸化水素生成の経時変化。ドパミン(300 μ M)を示した時間だけ自動酸化させた。

B: 二価鉄または三価鉄(10-100 μ M)存在下ドパミン(300 μ M)を24時間酸化させた。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. dopamine alone.

ドパミン毒性に対する鉄イオンの作用

鉄イオンは、ドパミン毒性に寄与すると考えられるドパミン酸化中間体および過酸化水素のいずれも減少させた。そこで、鉄イオンがドパミン毒性に与える影響について検討した。SH-SY5Y細胞に二価鉄または三価鉄(0.01-3 mM)をドパミン(300 μ M)と同時に24時間曝露すると、濃度依存的な保護作用を示した(図2-8A,B)。図2-7C-Eにその典型写真を示す。

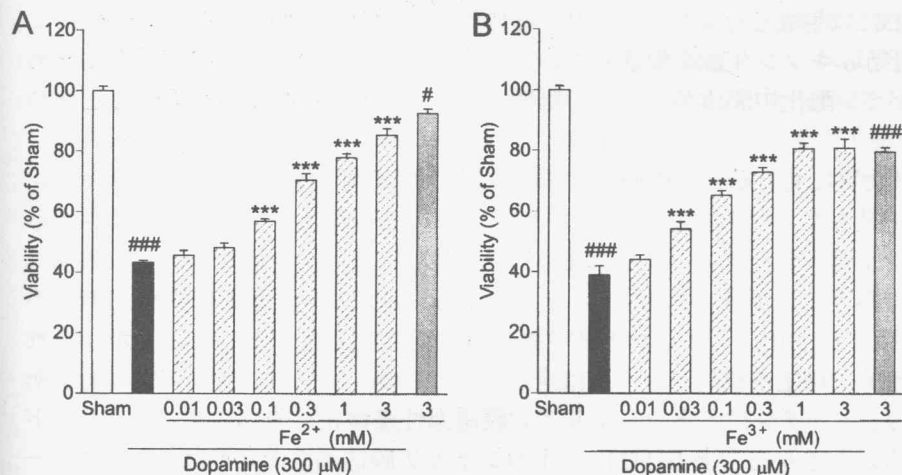
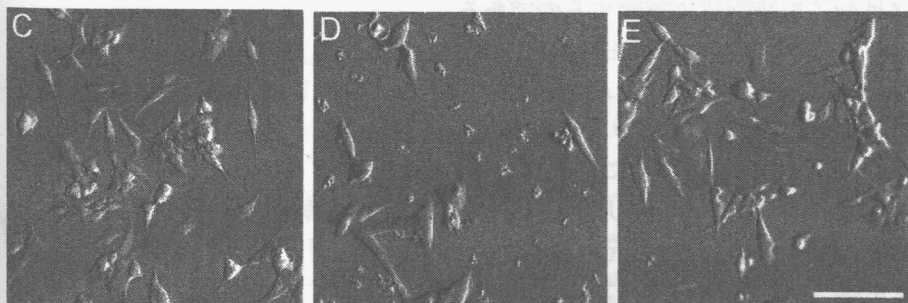


図2-8 ドパミン毒性に対する鉄イオンの保護作用

ドパミン毒性に対する二価鉄(A)および三価鉄(B)による保護作用の濃度依存性。二価鉄または三価鉄(0.01-3 mM)はドパミン(300 μ M)と同時に24時間投与した。写真は各々、sham処置群(C)、ドパミン(300 μ M)処置群(D)、ドパミン+二価鉄(1 mM)処置群である。スケールバーは100 μ mを示す。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. sham. *** $P < 0.001$ vs. dopamine alone.



考察

ドパミン毒性には自動酸化の過程で生成するスーパーオキシドや過酸化水素などのROSおよび α -キノンやアミノクロームなどの酸化中間体の関与が想定されるものの、それぞれの因子の寄与については解明されていない。SH-SY5Y細胞におけるドパミン毒性がGSH、NACおよびCysで抑制され、細胞内グルタチオンを枯渇させるBSOにより増悪したことは、ドパミン誘発細胞死にチオール化合物で抑制される因子の関与が示唆される。過酸化水素毒性は抗チオール酸化薬で抑制されたが、過去の報告と一致して[102,103]、過酸化水素除去酵素カタラーゼはドパミン毒性を部分的にしか抑制しなかった。したがって、少なくとも本実験の条件下では、ドパミン由来の過酸化水素はドパミン毒性を誘発する主要な因子ではないことが示唆される。実際、ドパミン(300 μ M)が24時間の自動酸化過程で発生する過酸化水素濃度は30-40 μ Mであり、細胞死への寄与は小さいと考えられる。キサンチン/キサンチンオキシダーゼ毒性がカタラーゼにより抑制されたことから、生成したスーパーオキシドは過酸化水素に変換して細胞毒性を発現することが考えられる。しかし、スーパーオキシドを過酸化水素に変換するSODはドパミン毒性を顕著に抑制した。したがって、スーパーオキシドは酸化ストレス以外の作用によりドパミン毒性に寄与していることが示唆される。

一方、ドパミン酸化中間体の生成は抗チオール酸化薬存在下では完全に抑制された。抗チオール酸化薬は生成した α -キノンを除去したが生成したアミノクロームには影響を与えなかったことから、 α -キノンと直接反応し捕捉することで下流のアミノクローム生成を抑制していることが考えられる。実際、GSHおよびCysのチオール基は、グルタチオントランスフェラーゼの存在下または非存在下において、 α -キノンと結合し5-S-グルタチオニル-および5-S-システニル-ドパミンを生成するが[104,105]、アミノクロームとは、グルタチオントランスフェラーゼの存在下においてのみ結合し、4-S-グルタチオニル-および4-S-システニル-5,6-ジヒドロキシインドリンを形成すること[106]が報告されている。カタラーゼはドパミン酸化中間体の生成には影響を及ぼさなかったが、SOD存在下では α -キノンの生成が減少した。ただし、SODには生成した α -キノンに対する作用が無かったため、ドパミン酸化により発生したスーパーオキシドが α -キノン生成を促進していることが考えられる。以上の結果をまとめると、ROSよりもむしろドパミン酸化中間体がドパミン毒性において主要な役割を担っていることが示唆される(図2-9A)。

α -キノンは、細胞内の求核物質に共有結合し機能障害を引き起こす[107]。タンパク中のシステイン残基のチオール基は細胞内で最も強力な求核物質の一つである。ドパミンをラット線条体に投与するとシステイン残基にドパミンが結合したタンパクが検出される[108]。タンパク中のシステイン残基はタンパク機能に重要な役割を担うことが多いため、 α -キノンによるシステイン残基の修飾が、THを不活性化し[109]、DAT機能を障害し[110]、ミトコンドリア複合体I活性を阻害すること[111]が知られている。ドパミン毒性に決定的な細胞内標的タンパクは定かではないが、ミトコンドリアが有力であるかもしれない。なぜならば、 α -キノンはミトコンドリアの膜透過性遷移孔を開口させ、ミトコンドリアを膨潤させるという報告があるからである[112]。ミトコンドリア膜透過性の亢進は、シトクロームcなどのプロアポトーシス性分子を細胞質に遊離するのである。

アミノクロームもまた、*in vivo*および*in vitro*において細胞毒性を示し[113,114]、さらに、パーキンソン病患者の中脳ではドパミンからアミノクロームを産生する酵素が増加していることが報告されている[115]。アミノクロームはNAD(P)H シトクロームP450還元酵素により非常に不安定で反応性の高いロイコアミノクローム α -セミキノラジカルに還元される[116,117]。ロイコアミノクローム α -セミキノラジカルは酸素分子により酸化され再びアミノクロームに戻る酸化還元サイクルに入る[116]。その際、酸素分子はスーパーオキシドに還元されるため、この酸化還元サイクルはROSを大量に産生しNAD(P)Hを枯渇させる。NAD(P)Hの枯渇は、グルタチオン還元酵素によるGSHへの還元を減少させ、ミトコンドリア電子伝達系でのATP産生を低下させる[118]。

鉄イオンはカテコール基に配位し酸化過程の触媒となり[119]、酸化中間体の生成を促進する[101,120]。しかし、これらの報告では、ドパミン酸化中間体量の測定に490 nm付近の吸光度を用いており、酸化の最終生成物メラニンの吸光度405 nmと干渉することが考えられる。従って、メラニンが

生成しない短時間での測定は可能であっても、経時変化のような長時間の測定には困難が予想される。そこで、ドパミン酸化中間体をHPLCにより分離し検出することで、二価鉄存在下でのドパミン酸化中間体量の経時変化を検討した。すると、二価鉄によって検出されるドパミン酸化中間体総量はむしろ低下していた。さらに、鉄イオンによりメラニンの生成を促進されたことから、鉄イオンがドパミン酸化中間体からメラニンへの変換を促進していることが示唆された。ドパミンの自動酸化が進行すると過酸化水素の産生量が増大するが、鉄イオンによるドパミン酸化の促進では過酸化水素産生は減少していた。これは、鉄イオンが過酸化水素を除去しているため、もしくは、過酸化水素の発生を抑制しているためであると考えられる。二価鉄は過酸化水素と反応してヒドロキシラジカルを生成するため(フェントン反応)、過酸化水素を減少させる。三価鉄は酸素分子の代わりにドパミン酸化過程の電子受容体として働くことができ、この場合、三価鉄が二価鉄に酸化されるため、酸素分子の場合産生するスーパーオキシドは発生しない。生理的条件下では二価鉄は急速に三価鉄に酸化され[121]、また、二価鉄と同様に三価鉄も過酸化水素産生を減少したことから、前者の可能性は低いと思われる。以上をまとめると、鉄イオンによるドパミン酸化の促進は、自動酸化とは異なり過酸化水素を発生させないことが示唆される(図2-9B)。

鉄イオンは、ドパミン酸化中間体および過酸化水素のいずれも減少させ、ドパミン毒性を顕著に抑制した。しかし、脂溶性二価鉄であるフェロセンはドパミン毒性を増強するという過去の報告がある[122]。フェロセンでは、二価鉄が2つのシクロペンタジエンによりキレートされており細胞膜透過性を高めている。本実験で用いた鉄イオンはいずれもドパミンと直接相互作用することでドパミン毒性を抑制したが、フェロセンはドパミンと直接相互作用することができないため、異なる結果に至ったと考えられる。鉄イオン以外の金属イオンもまた、ドパミン酸化を促進する[101]。しかし、過去の報告と一致して[123,124]、銅イオンやマンガンイオンはドパミン毒性を増強し、マンガンイオンによるドパミン毒性の増強はカタラーゼにより抑制されることを確認した。このことから、鉄イオン以外の金属イオンによるドパミン酸化の促進は過酸化水素産生を伴っていることが推測される。

本章をまとめると、ドパミン誘発細胞死にはドパミン酸化中間体が中心的な役割を果たしていること、鉄イオンはROS産生を伴わずドパミン酸化中間体量をメラニンに変換するためドパミン毒性を抑制することを明らかにした。鉄は、酸化ストレスの要因になるものの、必ずしもドパミンニューロン死を寄与するわけではないかもしれない。本章の研究結果は、未だ不明な点が多いパーキンソン病剖検脳における鉄の蓄積に新たな役割を提案するものである。

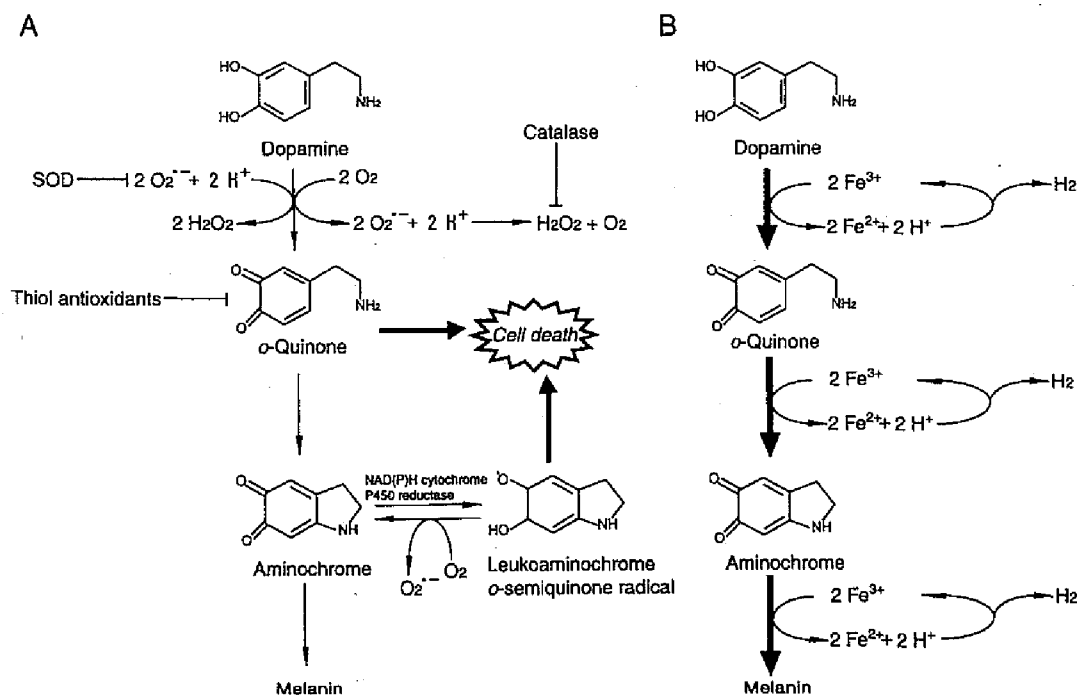


図 2-9 ドパミン誘発細胞死の機序(A)および鉄イオンによるドパミン酸化の促進機序(B)

第三章

プラミペキソールによるグルタミン酸神経毒性に対する 保護作用機序

パーキンソン病治療薬であるドパミンアゴニストは*in vitro*および*in vivo*の実験系で神経保護作用を発現する。その作用機序として、シナプス前終末のドパミン自己受容体に作用しドパミン代謝回転を減少させることや、ドパミン受容体を介した栄養因子の分泌が報告されている[125,126]。一方、受容体を介さない抗アポトーシス作用、抗酸化酵素の誘導や直接的なラジカル除去作用も知られている[127,128,129,130,131]。これらの基礎実験系での神経保護作用を根拠として、これまで治験が行なわれてきたが、パーキンソン病患者に対して明らかな神経保護効果を証明できたドパミンアゴニストはなかった。しかし、最近、Parkinson Study Groupが行った早期パーキンソン病に対する臨床研究で、アミノベンゾチアゾール誘導体で非麦角系のドパミンD_{2/3}受容体アゴニストであるプラミペキソール(図3-1)に神経保護効果の存在を示唆する報告が提出された。DATの基質である [¹²³I]2β-carboxymethoxy-3β-(4-iodophenyl) tropan (β-CIT) を用いて46カ月後までの線条体のSPECT(single-photon emission computed tomography)測定を行うと、β-CITの取込はレボドパで治療を開始した群よりもプラミペキソールで治療を開始した群の方が有意に多かった[132]。また、同時期に、別のドパミンアゴニストであるロピニロールについても同様の報告がなされた[133]。イメージングマーカーを用いたこれら二つの臨床研究報告では明確な結論が得られているとは言えないが、ドパミンアゴニストがパーキンソン病の進行に伴う神経変性を抑制あるいは遅延する作用を持つことが期待される。

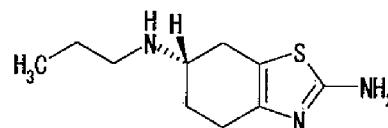


図3-1 S(-)-プラミペキソールの化学構造式

第一章で述べたように、グルタミン酸神経毒性はパーキンソン病進行期のドパミンニューロン死への関与が疑われるものの、グルタミン酸神経毒性に対するプラミペキソールの作用については検討されていない。そこで本章において、著者は、第一節においてプラミペキソールのグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討し、第二節においてその作用機序としてドパミンアゴニストが内在性ドパミンに与える影響について検討した。

実験方法

(1) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

第一章において用いた試薬については同じものを用いた。

S(-)およびR(+)-プラミペキソールはベーリンガーインゲルハイム株式会社(Ingelheim, Germany)より提供していただいた。ATPマグネシウム塩、ジギトニン、R(+)-2-dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (7-OH-DPAT)、(±)-スルピリド、ジアゼパムおよびテトロドトキシンはSigmaより購入した。R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SCH-23390)、(-)-キンピロールおよびR(+)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepine-7,8-diol (SKF-38393)はRBI (Natick, MA, USA)より購入した。R(+)-プロモクリプチンおよびドンペリドン はMP Biomedicalsより購入した。Fura 2-アセトキシメチルエステル(fura 2-AM)は同仁化学研究所(Kumamoto, Japan)より購入した。

(2) 中脳初代分散培養の作製と維持

第一章の実験方法(2)と同様の方法で行った。

(3) 株化細胞の調製と維持

第一章の実験方法(3)と同様の方法で行った。

(4) 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度測定は、蛍光カルシウム指示薬fura 2-AMを用いた蛍光カルシウムイメージング法により行った。細胞をKrebs-Ringer緩衝液で洗浄後、fura 2-AM (5 μ M)および0.1% HS含有Krebs-Ringer緩衝液中で37°C、30分間インキュベートした。インキュベート終了後、Krebs-Ringer緩衝液で5回洗浄して細胞内へのfura 2負荷を完了し、測定用チャンバーにセットした。蛍光イメージングには、超高感度テレビカメラを装着したカルシウム測定用画像解析装置ARGUS-100/HiSCAイメージングシステム(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を用いた。細胞に340 nmおよび380 nmの励起光を照射し、それぞれに対し500 nmの蛍光を測定した。Fura 2はカルシウム結合により励起波長のピークがブルーシフトし、340 nmで励起される蛍光強度は増大するのにに対し380 nmで励起した時は逆に減少する。測定データは、色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等に関係なくカルシウム濃度と対応づけられる340 nm/380 nmの蛍光強度比で表した。実験は室温にて行い、測定開始1分後にグルタミン酸(300 μ M)を投与し、測定開始10分後までデータを取得した。

(5) カテコラミンおよびその代謝物の測定

第一章の実験方法(7)と同様の方法で行った。

(6) 電子スピン共鳴(ESR)法によるロイコアミノクローム*o*-セミキノンラジカルの定量

ロイコアミノクローム*o*-セミキノンラジカルはPBS中でドパミン(10 mM)をHRP (0.5 U/ml)と過酸化水素(10 mM)により酸化させることで生成した。反応液を平型石英キュベットに移し、ESR分光装置(JEOL, Tokyo, Japan)に固定し、反応開始から正確に2.5分後に測定した。ESR分光装置の測定条件は以下の通りである；磁場：337.8 \pm 5 mT、マイクロ波：8 mW、変調周波数：9.45 GHz、変調振幅：100 μ T、反応時間：0.1 sec、温度：25°C、振幅：1 \times 1000、掃引時間：2 min。ロイコアミノクローム*o*-セミキノンラジカル量は、内部標準として用いたMn²⁺のシグナル強度に対するロイコアミノクローム*o*-セミキノンラジカルの二番目のピークの相対強度として表した。

(7) 細胞内プラミペキソールの測定

プラミペキソールは約350 mVの酸化還元電位を有することが知られており[134]、第一章の実験方法(7)と同様の方法で細胞内プラミペキソールを定量した。

(8) ウェスタンブロッティング

第一章の実験方法(9)と同様の方法で行った。

(9) TH活性の測定

第一章の実験方法(10)と同様の方法で行った。

(10) MAO活性の測定

第一章の実験方法(11)と同様の方法で行った。

(11) メラニン生成の測定

第二章の実験方法(5)と同様の方法で行った。

(12) [³H]標識ドパミンの遊離量の測定

第一章の実験方法(8)と同様の方法で行った。

(13) [^3H]標識ドパミンの小胞内取込量の測定

ドパミン分解を防ぐため、実験は全て、10 μM パルギリン、1mM アスコルビン酸含有グルタミン酸カリウム緩衝液(150 mM potassium glutamate, 20 mM HEPES, 4 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , pH 7.0)中で行った。細胞をPBSで洗浄後、グルタミン酸カリウム緩衝液で回収した。10 μM ジギトニン含有グルタミン酸カリウム緩衝液で再懸濁し37°C5分間インキュベートすることで、細胞膜の透過処理を行った。透過処理後、氷冷グルタミン酸カリウム緩衝液を加え、1,000 \times gで2分間遠心し、ジギトニンを含む上清を除去した。ペレットを2倍濃度の薬物を含むグルタミン酸カリウム緩衝液で再懸濁し、等量の100 nM [^3H]標識ドパミンおよび10 mM MgATP含有グルタミン酸カリウム緩衝液を加え、37°C、30分間インキュベートした。インキュベート終了後、氷冷グルタミン酸カリウム緩衝液を加え、1,000 \times gで2分間遠心することを2回繰り返し、取り込まれなかった[^3H]標識ドパミンを除去した。ペレットを0.4% Triton X-100で溶解し、[^3H]標識ドパミンを液体シンチレーションカウンターにより定量した。非特異的なバックグラウンドとして、10 μM レセルピン処置群の値を計測値から引いた。

(14) 統計処理

第一章の実験方法(13)と同様の方法で行った。

実験結果

第一節 プラミペキソールのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用

プラミペキソールのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用

中脳初代培養細胞を用いて、プラミペキソールがグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対して保護作用を示すか否かを検討した。プラミペキソール(1 mM)を24時間前投与し、グルタミン酸と同時に24時間曝露したところ、ドパミンニューロン数の減少が抑制された(図3-2A-C)。次に、プラミペキソールの保護作用における投与時間の影響について検討した。プラミペキソール(1 mM)は24時間の前投与のみ、もしくは、グルタミン酸との同時投与のみによっても有意な保護作用を示したが、24時間前投与および同時投与を行った場合において最も顕著な保護作用が観察された(図3-2D)。また、グルタミン酸神経毒性に対するプラミペキソールの保護作用は濃度依存的であり、100 μ M以上の濃度で有意であった(図3-2E)。

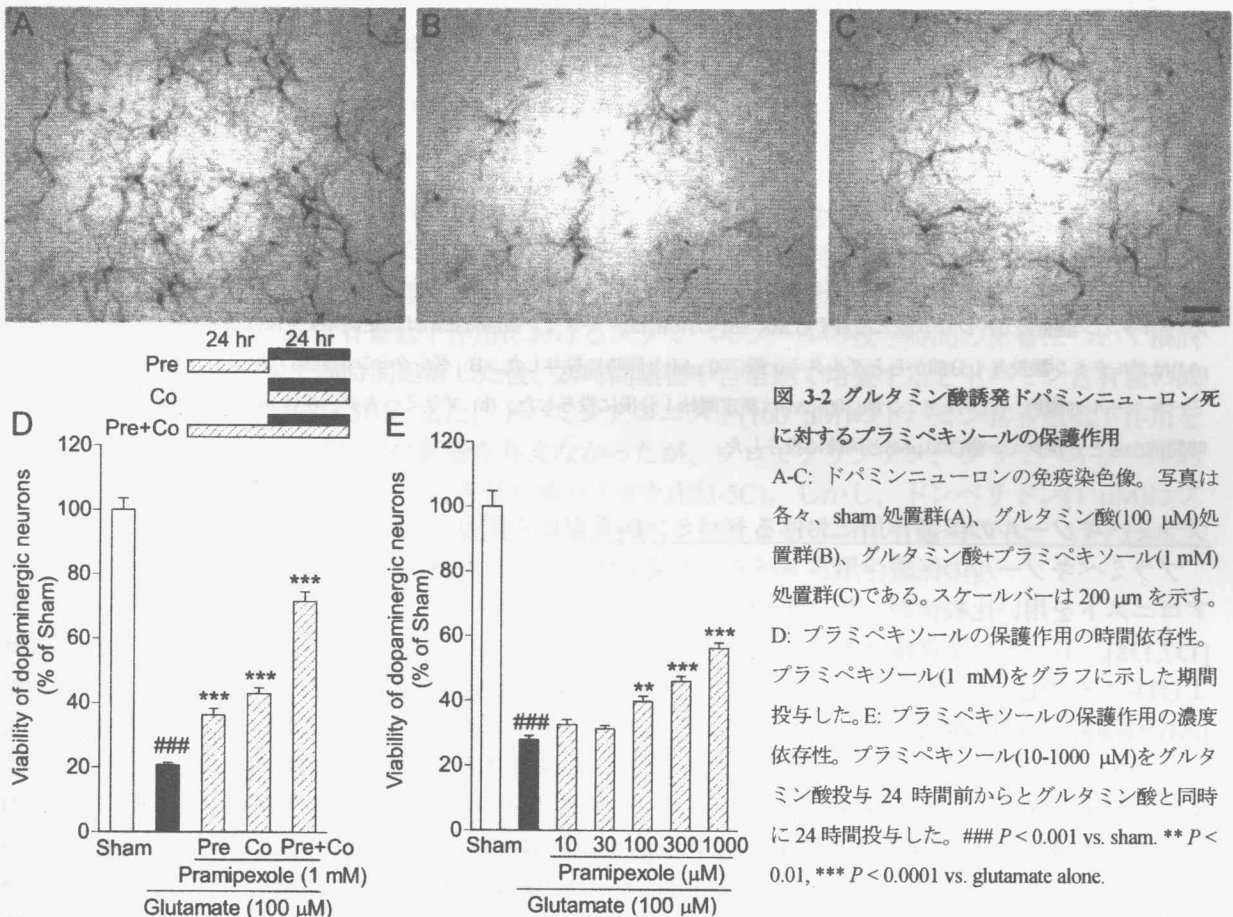


図 3-2 グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対するプラミペキソールの保護作用

A-C: ドパミンニューロンの免疫染色像。写真は各々、sham 処置群(A)、グルタミン酸(100 μ M)処置群(B)、グルタミン酸+プラミペキソール(1 mM)処置群(C)である。スケールバーは200 μ mを示す。

D: プラミペキソールの保護作用の時間依存性。プラミペキソール(1 mM)をグラフに示した期間投与した。E: プラミペキソールの保護作用の濃度依存性。プラミペキソール(10-1000 μ M)をグルタミン酸投与 24 時間前からとグルタミン酸と同時に24時間投与した。### $P < 0.001$ vs. sham. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. glutamate alone.

プラミペキソールのグルタミン酸誘発細胞内カルシウム濃度上昇に対する作用

ドパミン D_2 受容体の刺激は、カリウムチャネルの開口やカルシウムチャネルの抑制などにより細胞膜安定化作用を発現することが知られている[135,136]。グルタミン酸神経毒性にはNMDA受容体を介したカルシウム流入が重要であることは第一章で示した。NMDA受容体はマグネシウムにより電位依存的な閉塞阻害を受けているため、ドパミン D_2 受容体の刺激による細胞膜安定化作用がプラミペキソールの保護作用に寄与している可能性がある。そこで、グルタミン酸誘発カルシウム流入に対するプラミペキソールの作用について検討した。グルタミン酸誘発細胞内カルシウム濃度上昇は、NMDA受容体アンタゴニストであるMK-801 (10 μ M)を1分間前投与およびグルタミン酸(300 μ M)と同時投与することで抑制されたが、プラミペキソール(1 mM)を24時間前投与および同時投与しても影響は無かつ

た(図3-3A, B)。

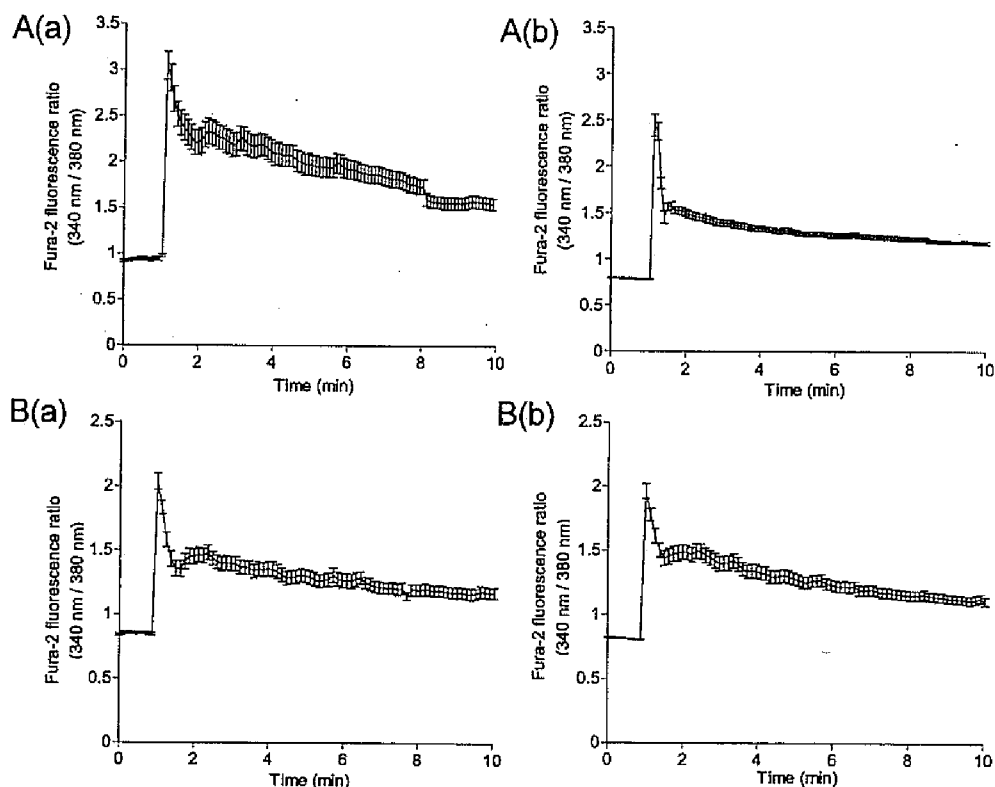


図 3-3 グルタミン酸誘発カルシウム流入に対するプラミペキソールの作用

A: グルタミン酸誘発カルシウム流入に対するMK-801の作用。(a)グルタミン酸(300 μ M)は測定開始1分後に投与した。(b)MK-801 (10 μ M)はグルタミン酸投与1分前からとグルタミン酸(300 μ M)と同時に投与した。B: グルタミン酸誘発カルシウム流入に対するプラミペキソールの作用。(a)グルタミン酸(300 μ M)は測定開始1分後に投与した。(b) プラミペキソール(1 mM)はグルタミン酸投与24時間前からとグルタミン酸(300 μ M)と同時に投与した。

プラミペキソールの保護作用におけるドパミンD₂受容体の関与

プラミペキソールの保護作用がドパミンD₂受容体を介するか明らかにするため、選択的なドパミンアゴニストを用い比較検討した。今回用いたドパミンアゴニストの受容体に対するK_i値を表3-1に示す[137,138]。ドパミン受容体は大きく2つのサブファミリーに分けられる、すなわちD₁タイプ(D₁, D₅)およびD₂タイプ(D₂, D₃, D₄)である。ドパミンアゴニスト(100 μ M)を24時間前投与し、グルタミン酸(100 μ M)と同時に24時間曝露したところ、ドパミンD₁タイプアゴニストのSKF-38393は保護作用を示さなかったが、ドパミンD₂タイプアゴニストであるブロモクリプチン、プラミペキソール、7-OH-DPATは有意な保護作用を示した(図3-4A)。しかし、ドパミンD₂タイプアンタゴニストのドンペリドン(10 μ M)はプラミペキソールの保護作用を減弱させなかった(図3-4B)。プラミペキソールは光学活性を有しS(-)体であるが、ドパミンD₂受容体への親和性の弱い鏡像異性体のR(+)-体が存在する[139]。受容体への親和性は異なるにも関わらず、いずれの鏡像異性体もグルタミン酸神経毒性に対し同程度の保護作用を示した(図3-4C)。

表 3-1 ドパミンアゴニストのK_i値の比較

K _i (nM)	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Bromocriptine ^a	>1000	3.3	5.0	18.0
Pramipexole ^a	>1000	6.9	0.9	15.0
7-OH-DPAT ^a	>1000	1.0	0.2	135.0
SKF-38393 ^b	68.0	>1000	>1000	>1000

^aK_i値は Piercey et al. (1996)より引用。

^bK_i値は Kraxner et al. (2000)より引用。

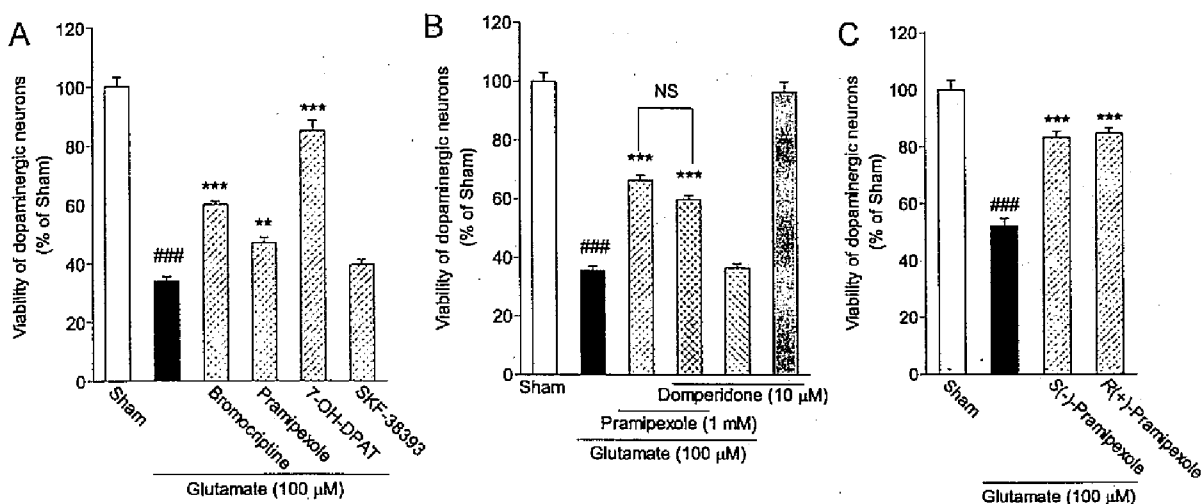


図 3-4 グルタミン酸神経毒性に対するドパミンアゴニストの作用

A: 各ドパミンアゴニスト(100 μM)をグルタミン酸投与 24 時間前からとグルタミン酸と同時に 24 時間投与した。B: ドンペリドン(10 μM)はプラミペキソール(1 mM)と一緒にグルタミン酸投与 24 時間前からとグルタミン酸と同時に 24 時間投与した。C: S(-)または R(+)-プラミペキソール(1 mM) をグルタミン酸投与 24 時間前からとグルタミン酸と同時に 24 時間投与した。### $P < 0.001$ vs. sham. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. glutamate alone. NS; not significant.

ドパミン含有量に対するプラミペキソールの作用

第一章において、グルタミン酸神経毒性には内在性ドパミンが関与することを示した。そこで、プラミペキソールが内在性ドパミンに対して影響を与えるか否かを検討した。中脳初代培養細胞にプラミペキソール(1-1000 μM)を24時間曝露したところ、ドパミン含有量が濃度依存的に顕著に減少した(図3-5A)。次に、ドパミン含有量低下作用におけるプラミペキソールの投与時間の影響について検討した。プラミペキソールで24時間処置した後、24時間薬物不含培地で培養するとドパミン含有量の減少は、部分的に回復した(図3-5B)。また、ドパミンアゴニスト(100 μM)のドパミン含有量低下作用を比較検討したところ、SKF-38393は影響を与えなかったが、プロモクリプチン、プラミペキソールおよび7-OH-DPATはいずれもドパミン含有量を減少させた(図3-5C)。しかし、ドンペリドン(1 μM)はプラミペキソール(100 μM)によるドパミン含有量低下作用を減弱させず(図3-5D)、さらに、いずれのプラミペキソールの鏡像異性体も同程度のドパミン含有量低下作用を示した(図3-5E)。

ロイコアミノクロームo-セミキノンジカルに対するプラミペキソールの作用

第二章において、ドパミン誘発細胞死にはその酸化中間体が寄与することを示した。アミノクロームの一電子還元で生成し最も反応性の高い酸化中間体の一つであるロイコアミノクロームo-セミキノンジカルに対するプラミペキソールの作用について検討した。ロイコアミノクロームo-セミキノンジカルは、ESR測定により4つの波を有する特徴的なシグナルを示した(図3-6A)。プラミペキソール(1-10 mM)はロイコアミノクロームo-セミキノンジカルのシグナル強度を濃度依存的に減弱させた(図3-6A,B)。

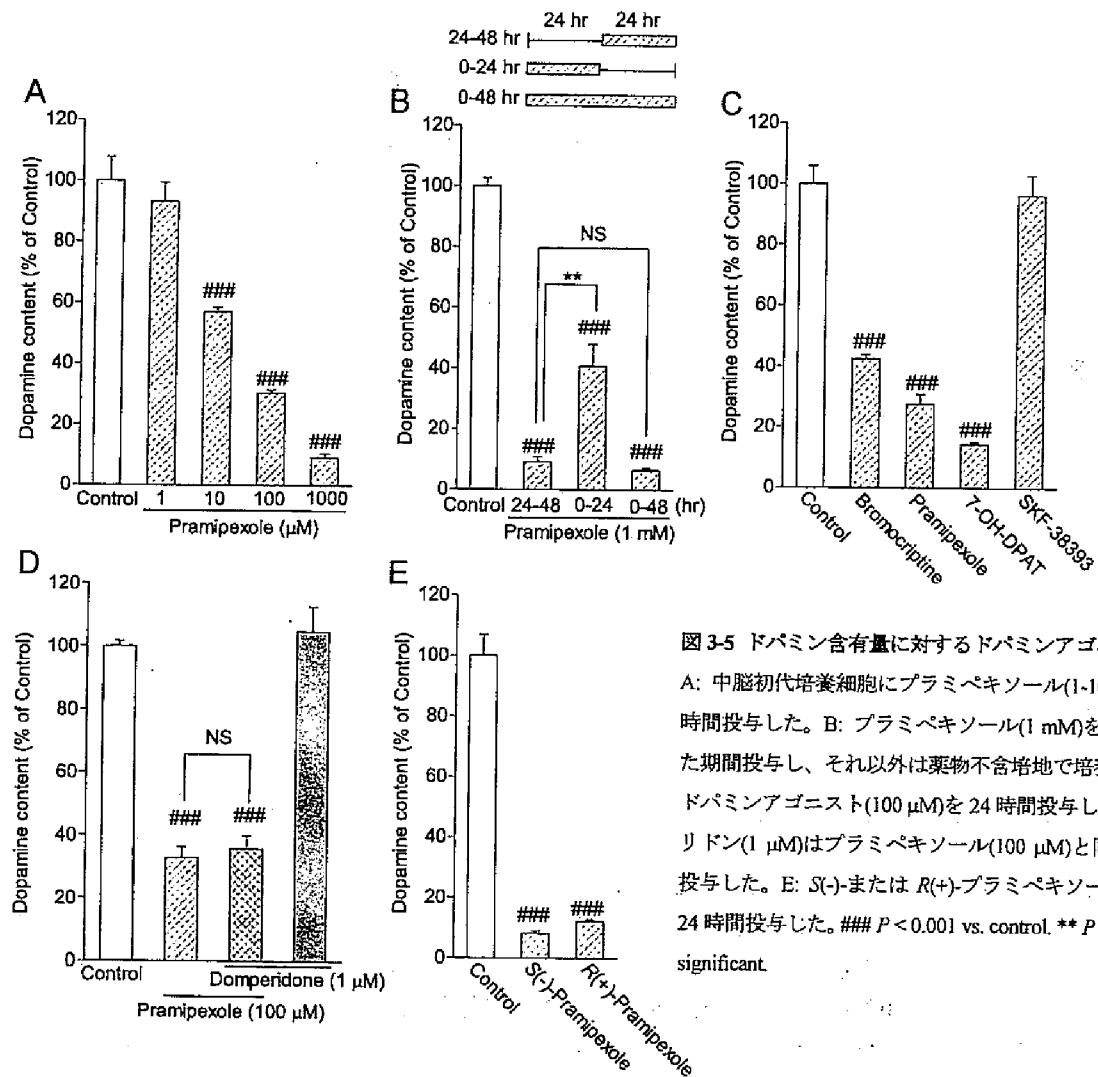


図3-5 ドパミン含有量に対するドパミンアゴニストの作用
 A: 中脳初代培養細胞にプラミペキソール(1-1000 μM)を24時間投与した。B: プラミペキソール(1 mM)をグラフに示した期間投与し、それ以外は薬物不含培地で培養した。C: 各ドパミンアゴニスト(100 μM)を24時間投与した。D: ドンペリドン(1 μM)はプラミペキソール(100 μM)と同時に24時間投与した。E: S(-)またはR(+)-プラミペキソール(1 mM)を24時間投与した。^{###} $P < 0.001$ vs. control. ^{**} $P < 0.01$. NS: not significant.

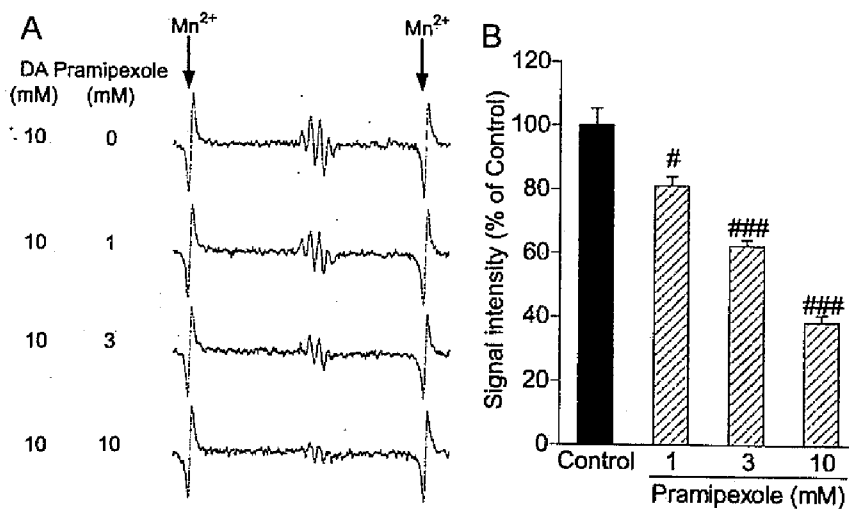


図3-6 ロイコアミノクローム α -セミキノラジカルに対するプラミペキソールの作用
 A: ロイコアミノクローム α -セミキノラジカルのESRチャート。B: プラミペキソールのロイコアミノクローム α -セミキノラジカル除去能の濃度依存性。ドパミン(DA; 10 mM)からロイコアミノクローム α -セミキノラジカルを生成させ、プラミペキソール(1-10 mM)を加えた。シグナル強度は内部標準(Mn^{2+})のシグナルに対する相対強度で表した。[#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.001$ vs. control.

第二節 ドパミンアゴニストの内在性ドパミンに対する作用

PC12細胞におけるドパミン含有量に対するプラミペキソールの作用

中脳初代培養細胞においてプラミペキソールがドパミン含有量を減少させることを、前節において示した。中脳初代培養細胞はヘテロな細胞系であり、ドパミンニューロンの割合は2-3%しか過ぎない。そこで、ドパミン含有量低下の詳細な機序を明らかにするため、以降、PC12細胞を用いて検討を行った。PC12細胞はドパミンD₂,₃,₄受容体を発現し[140,141]、ドパミンを生成、貯蔵、遊離、代謝するなど[142,143]ドパミンニューロンと類似の神経化学的性質を有している[144]。本研究で用いたPC12細胞はドパミンおよびノルアドレナリンを産生し、それぞれの含有量は 57 ± 1.8 nmol/mg proteinおよび 4.1 ± 0.43 nmol/mg proteinであった。PC12細胞にプラミペキソール(10-1000 μ M)を曝露すると、濃度依存的にドパミンおよびノルアドレナリン含有量が減少した(図3-7A,B)。次に、細胞内ドパミン代謝物に対する作用を検討した。プラミペキソールによりDOPACおよびHVA含有量は部分的に減少したが、ドパミンに比べ影響は少なかった(図7C,D)。 α -MT (1 mM)は細胞内カテコラミンおよびドパミン代謝物をともに減少させた。一方、レセルピン(10 μ M)は細胞内カテコラミンを顕著に減少させたものの、ドパミン代謝物の減少は軽度であった。パルギリン(10 μ M)は細胞内カテコラミンを増加し、ドパミン代謝物を減少させた(図3-7A-D)。また、PC12細胞にプラミペキソール(10-1000 μ M)を曝露すると、細胞内にプラミペキソールが検出され、濃度依存的に増加した(図3-8)。

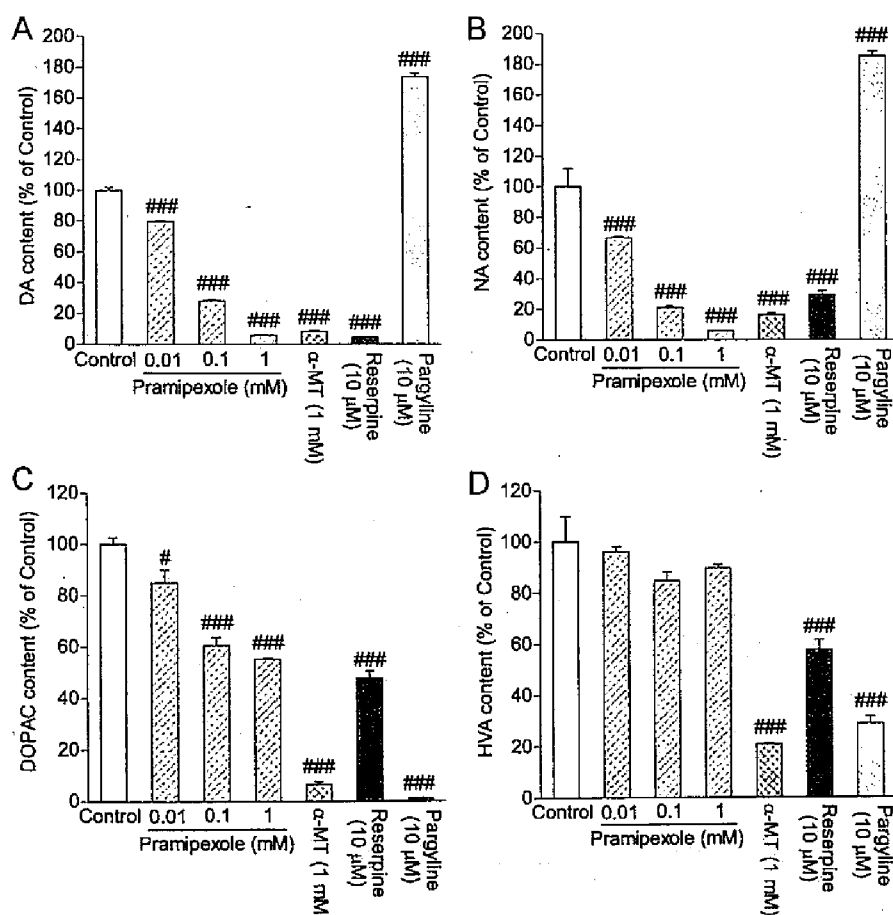


図 3-7 細胞内カテコラミンに対するプラミペキソールの作用

プラミペキソール(0.01-1 mM)、 α -MT (1 mM)、レセルピン(10 μ M)またはパルギリン(10 μ M)を PC12 細胞に 24 時間投与した後、細胞内(A)ドパミン(DA)、(B)ノルアドレナリン(NA)、(C) DOPAC および(D) HVA 量を測定した。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. control.

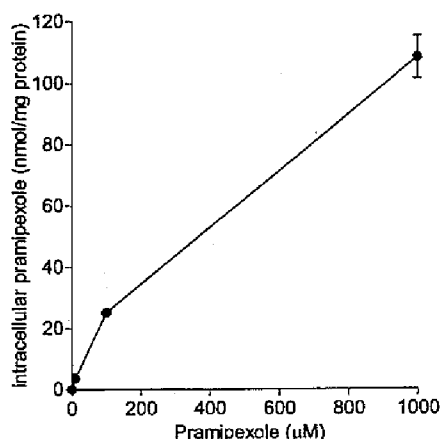


図3-8 細胞内プラミペキソール量の測定

プラミペキソール(10-1000 μM)を24時間投与した後、細胞内プラミペキソール量を測定した。

PC12細胞におけるドパミン含有量に対するドパミンアゴニスト/アンタゴニストの作用

ドパミン含有量低下におけるドパミン受容体の関与を明らかにするために、ドパミンアゴニスト/アンタゴニストの作用について検討した。R(+)-プラミペキソール(PPX)はS(-)体に比べドパミン含有量低下作用は強かった。麦角誘導体でD₂タイプアゴニストであるブロモクリプチン(BRC)およびD₃受容体への選択性の高いD₂タイプアゴニストである7-OH-DPAT (DPAT)はドパミン含有量を減少させたが、自己受容体への選択性の高いD₂タイプアゴニストであるキンピロール(QNP)はドパミン含有量を増加させた。D₂タイプアンタゴニストのうち、スルピリド(SLP)は影響を与えなかったが、ドンペリドン(DMP)は最も低濃度からドパミン含有量を低下させた。また、D₁タイプアゴニストのSKF38393 (SKF)およびD₁タイプアンタゴニストのSCH23390 (SCH)は、ともにドパミン含有量を減少させた。ドパミン受容体に作用しない薬物としてジアゼパム(DZP)は、ドパミン含有量に何ら影響を与えなかった(図3-9A)。また、スルピリド(100 μM)はプラミペキソール(100 μM)によるドパミン含有量低下作用を減弱させなかった(図3-9B)。

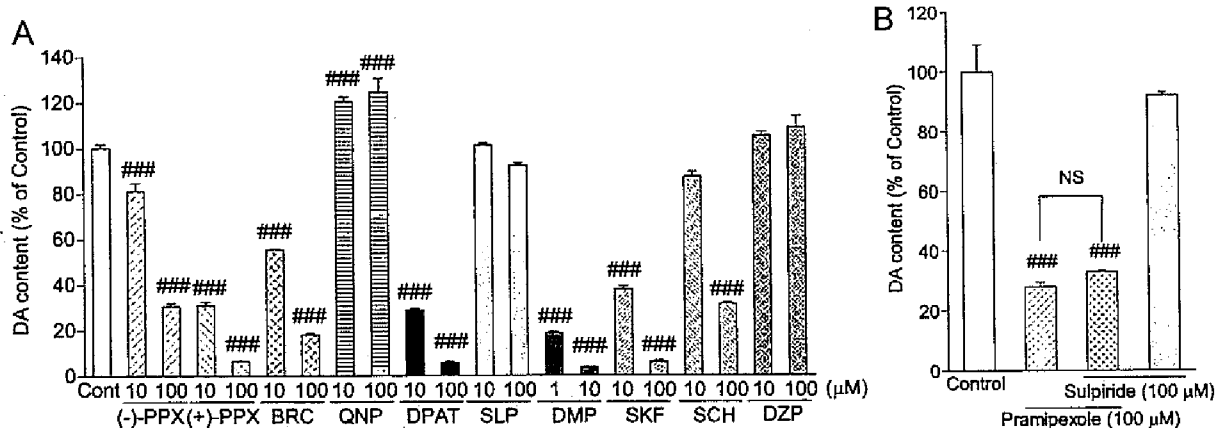


図3-9 ドパミン含有量に対するドパミンアゴニスト/アンタゴニストの作用

A:各ドパミンアゴニスト/アンタゴニストを24時間投与した。B: スルピリド(100 μM)はプラミペキソール(100 μM)と同時に24時間投与した。### $P < 0.001$ vs. control. NS: not significant.

ドパミンアゴニスト/アンタゴニストによるドパミン含有量低下作用の可逆性

プラミペキソールによるドパミン含有量低下作用の経時変化について検討した。プラミペキソール(PPX; 1 mM)投与30分後にはドパミン含有量は顕著に減少し、2時間後にはほぼ完全に枯渇した。その後薬物不含培地に置き換え、さらに2時間インキュベートするとほぼ処置前のレベルにまで回復した(図3-10A)。図3-9Aにて、ドパミン含有量を減少させたブロモクリプチン(BRC)、7-OH-DPAT (DPAT)、ドンペリドン(DMP)、SKF38393 (SKF)およびSCH23390 (SCH)を24時間処置後、薬物不含培地に2時間置き換えるといずれの薬物においてもドパミン含有量の低下は有意に回復した(図3-10B)。

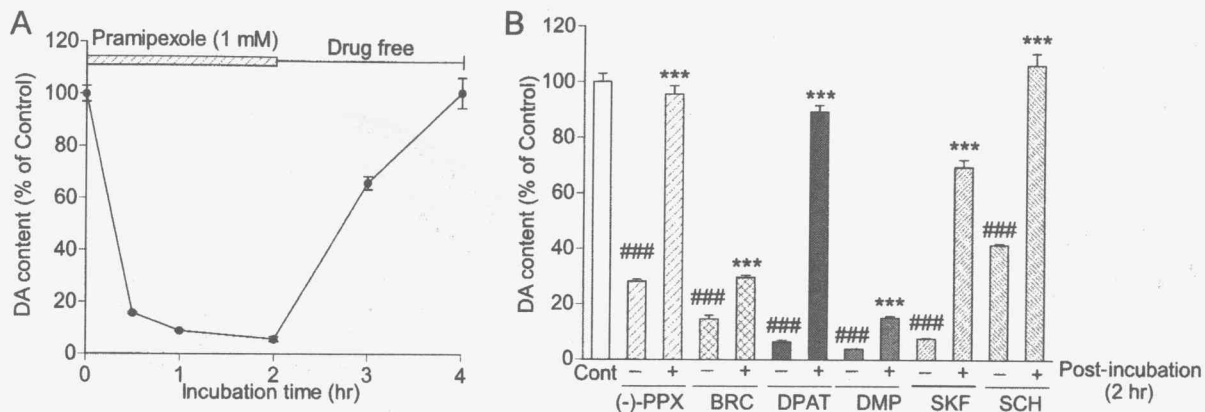


図3-10 ドパミン含有量低下の可逆性

A: プラミペキソール(1 mM)を2時間投与した後、薬物不含培地で2時間培養したときのドパミン含有量の経時変化。B: 各ドパミンアゴニスト/アンタゴニストを24時間投与後、薬物不含培地で2時間ポストインキュベートした。ドンペリドン(10 μ M)以外のドパミンアゴニスト/アンタゴニストの濃度は100 μ Mである。### $P < 0.001$ vs. control. *** $P < 0.001$ vs. post-incubation (-).

ドパミン生合成におけるプラミペキソールの作用

プラミペキソールによるドパミン含有量減少の機序の一つとして、生合成の低下が考えられる。そこで、リン酸化THのタンパク量について検討した。PC12細胞にプラミペキソール(0.1-1 mM)を24時間曝露しても、リン酸化THのタンパク量に変化は無かった(図3-11A)。同様に中脳初代培養細胞を用いて検討したが、プラミペキソールはリン酸化THのタンパク量に影響を与えなかった(データ省略)。さらに、プラミペキソール(100-1000 μ M)処置後のPC12細胞において、TH活性は部分的に低下したが、 α -MTと比べその程度は小さかった(図3-11B)。

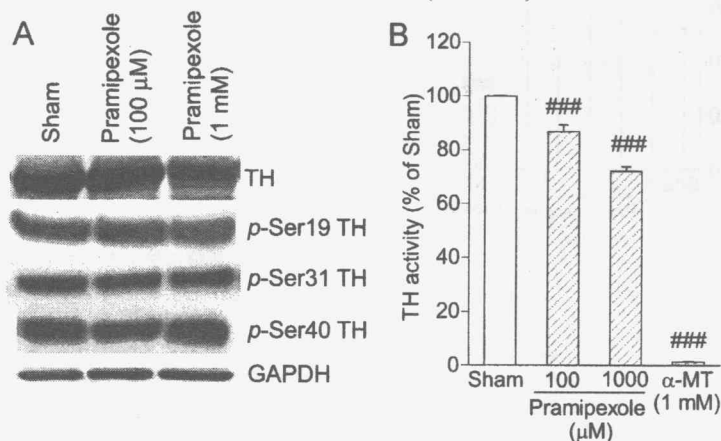


図3-11 THリン酸化およびTH活性に対するプラミペキソールの作用

(A)プラミペキソール(0.1-1 mM)を24時間投与した後のTH、リン酸化TH(p-Ser TH)およびGAPDHのウェスタンプロテイング像。(B)プラミペキソール(100-1000 μ M)を24時間または α -MT(1 mM)を24時間投与した後のTH活性。### $P < 0.001$ vs. sham.

ドパミン代謝におけるプラミペキソールの作用

図3-7CおよびDで示したように、プラミペキソールにより細胞内ドパミン代謝物はドパミンほど減少しなかった。したがって、ドパミン代謝回転が亢進している可能性がある。しかし、プラミペキソール(10-1000 μ M)の24時間処置によりMAO活性は影響を受けなかった(図3-12A)。また、プラミペキソール(10-1000 μ M)はメラニンの生成を抑制し、ドパミン自動酸化を遅延させた(図3-12B)。

ドパミン遊離におけるプラミペキソールの作用

細胞外へのドパミン遊離が細胞内含有量の減少に寄与することが考えられる。細胞内に取り込ませた $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンは、高濃度カリウム(+60 mM)刺激と同様に、プラミペキソール(0.1-1 mM)の処置により濃度依存的に細胞外に遊離した(図3-13A)。しかし、培養24時間に遊離されたドパミンおよびドパミン代謝物は、プラミペキソール処置によりむしろ減少した(図3-13B-D)。したがって、プラミペキソールによるドパミン遊離の亢進は一過性であることが示唆された。

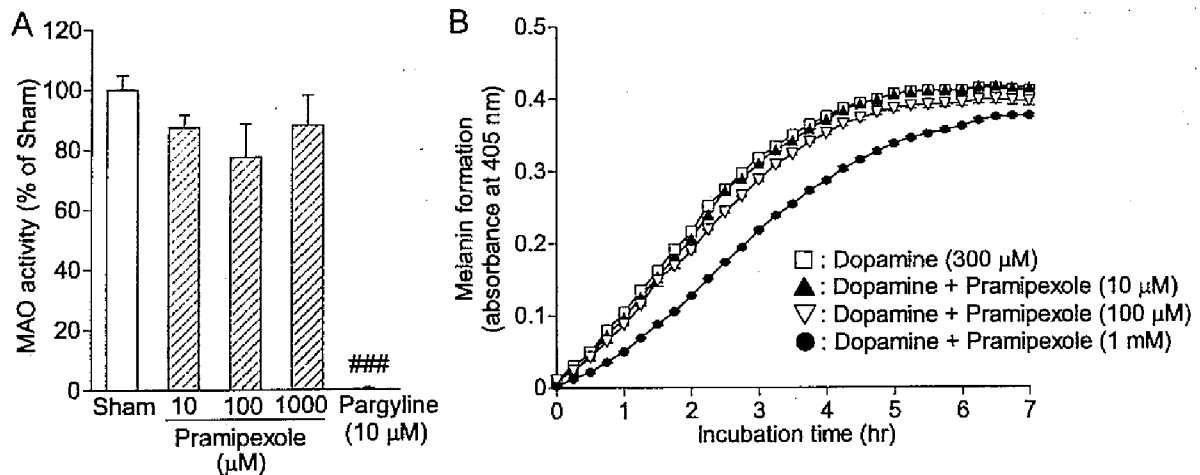


図 3-12 MAO 活性およびドパミン自動酸化に対するプラミペキソールの作用

A: プラミペキソール(10-1000 μ M)またはパルギリン(10 μ M)を 24 時間投与後、MAO 活性を測定した。B: プラミペキソールによるメラニン生成量の経時変化。プラミペキソール(10-1000 μ M) 存在下または非存在下ドパミン(300 μ M)を示した時間だけ自動酸化させた。### $P < 0.001$ vs. sham.

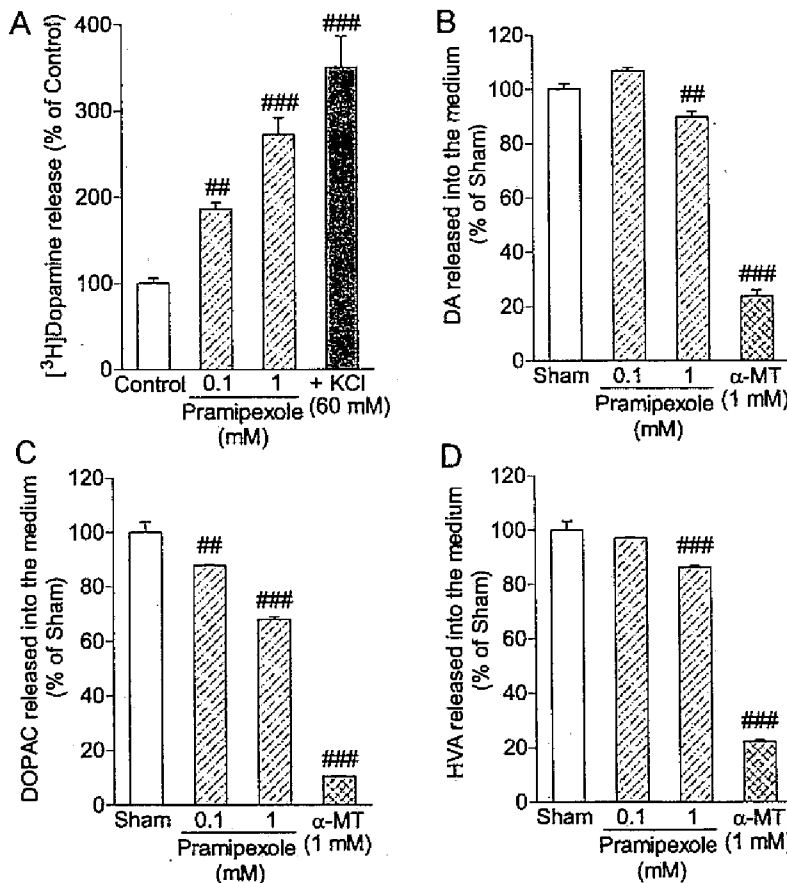


図 3-13 ドパミン遊離に対するプラミペキソールの作用

A: [³H]ドパミンを細胞に取り込ませた後、プラミペキソール(0.1-1 mM)または KCl (+60 mM)を投与した。(B-D)プラミペキソール(0.1-1 mM)または α -MT (1 mM)を 24 時間投与し、培地中に遊離されたドパミン(B)、DOPAC (C)、HVA (D) 量を測定した。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. control or sham.

プラミペキソールによるドパミン含有量低下作用における開口遊離の関与

プラミペキソールによるドパミン含有量の低下はドパミン遊離を伴うことが示された。そこでドパミン遊離機構として、脱分極による開口遊離が関与するか検討した。しかし、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害薬テトロドトキシン(1 μ M)はプラミペキソール(1 mM)によるドパミン含有量低下作用を減弱させなかった(図3-14)。

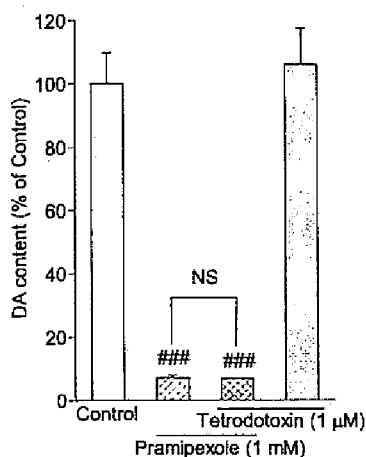


図3-14 プラミペキソールによるドパミン含有量低下に対するテトロドトキシンの作用
テトロドトキシ(1 μM)はプラミペキソール(1 mM)と同時に24時間投与した。### $P < 0.001$ vs. control. NS: not significant.

ドパミンの小胞内取込におけるドパミンアゴニスト/アンタゴニストの作用

レセルピンは一過性の遊離を介して細胞内ドパミンを枯渇させることが知られている[145]。また、図3-6CおよびDにおいてドパミン代謝物が部分的に減少するといった特徴がプラミペキソールとレセルピンで類似する。そこで、ジギトニンにより細胞膜のみ可溶化したPC12細胞を用いて、プラミペキソールによる $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの小胞内取込阻害作用について検討した。プラミペキソール(10-1000 μM)は $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの小胞内取込を濃度依存的に抑制した(図3-15A)。中脳初代培養細胞を用いた場合も同様に、プラミペキソール(0.1-1 mM)は $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの小胞内取込を有意に抑制した(データ省略)。ドパミンアゴニスト/アンタゴニストによるVMAT阻害作用について比較検討したところ、*S*(-)-プラミペキソール(PPX)、SKF38393 (SKF)およびSCH23390 (SCH)の阻害作用は弱く、*R*(+)-プラミペキソール、プロモクリプテン(BRC)および7-OH-DPAT (DPAT)は中程度の阻害作用を示し、ドンペリドン(DMP)は最も強力に $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの小胞内取込に抑制した。一方、キンピロール(QNP)およびスルピリド(SLP)は何ら影響を与えなかった(図3-15B)。

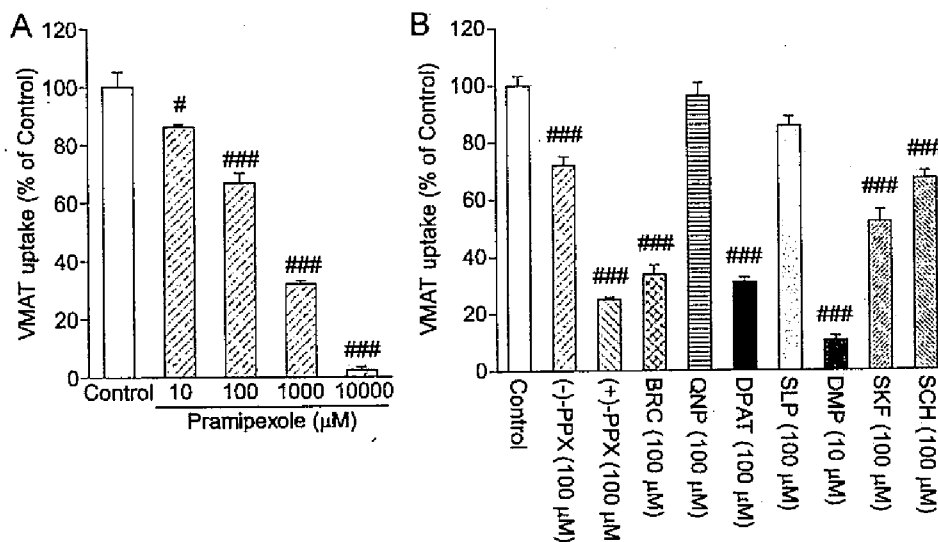


図3-15 ドパミン小胞内取込に対するプラミペキソールの作用

A: VMATに対するプラミペキソールの阻害作用の濃度依存性。B: VMATに対するドパミンアゴニスト/アンタゴニストの作用。ジギトニンで細胞膜を可溶化し、ドパミンアゴニスト/アンタゴニスト存在下 $[^3\text{H}]$ ドパミンを小胞に取り込ませた。# $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. control.

プラミペキソールによるドパミン小胞内取込阻害機序

プラミペキソールの阻害様式を解明するために、ドパミン小胞内取込の速度論について検討した。 $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの濃度(25, 50, 100, 200, 400 nM)を変化させ、プラミペキソール(100, 500 μM)存在下または非存在下で小胞内取込速度(UPTAKE)を測定した(図3-16A)。 $[^3\text{H}]$ 標識ドパミンの濃度毎に、プ

ラミペキソールの濃度に対してUPTAKEの逆数をプロット(Dixonプロット、図3-16B)して得られた直線は互いにx軸よりも上で交差することより、小胞取込に対しプラミペキソールは競合型もしくは混合型の阻害をしていることが示唆される。また阻害定数(K_i)は、各々の直線の交点を与えるプラミペキソールの濃度($-K_i$)から $183 \pm 17 \mu\text{M}$ であると算出された[146]。また、 $[\text{^3H}]$ 標識ドパミン濃度の逆数に対しDixonプロットにおける傾き(Slope)を再プロットし得られた直線が原点を通過することより、プラミペキソールの阻害様式は競合阻害であることが明らかになった(図3-16C)[147]。さらに、 $[\text{^3H}]$ 標識ドパミン濃度の逆数に対しUPTAKEの逆数をプロット(Lineweaver-Burkプロット、図3-16D)して得られた直線が互いにy軸上で交差することより、プラミペキソールの競合阻害が確認された。また、プラミペキソール濃度に対しLineweaver-Burkプロットにおける傾き(Slope)を再プロットし得られた直線とx軸との交点($-K_i$)より、 K_i 値が $154 \mu\text{M}$ と算出された[148]。

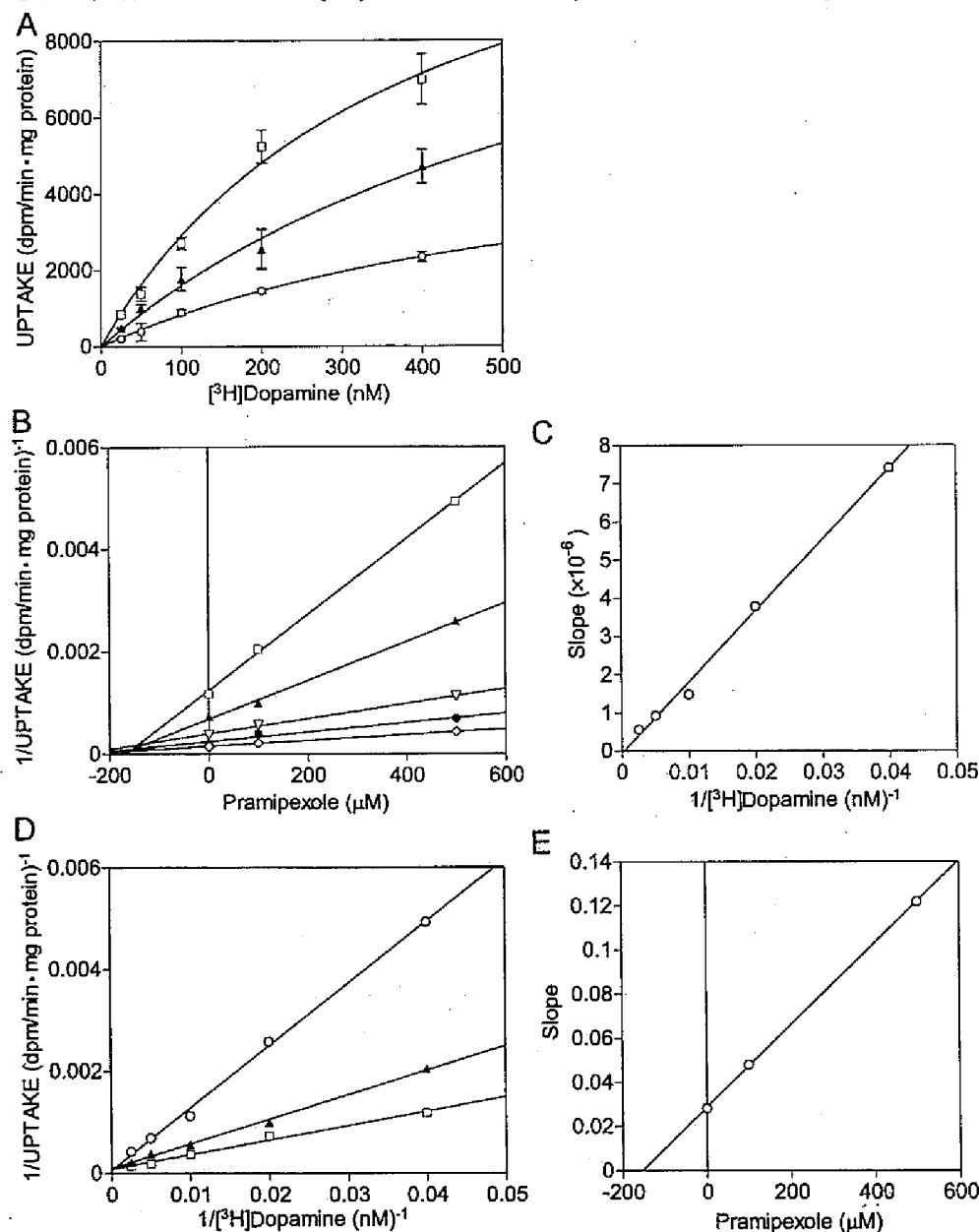


図 3-16 プラミペキソールによるドパミン小胞内取込の阻害様式

ジギトニンで細胞膜を可溶化し、プラミペキソール(100-500 μM)存在下 $[\text{^3H}]$ ドパミン(25, 50, 100, 200, 400 nM)を小胞に取り込ませた。
A: 小胞内取込速度(UPTAKE)は取り込まれた $[\text{^3H}]$ ドパミン量を取込時間とタンパク濃度で割った。コントロール(\square)、100 μM プラミペキソール(\blacktriangle)、500 μM プラミペキソール(\circ)。B: Dixon プロット。 $[\text{^3H}]$ ドパミン濃度: 25 nM (\square)、50 nM (\blacktriangle)、100 nM (∇)、200 nM (\bullet)、400 nM (\diamond)。C: Dixon プロットの再プロット。D: Lineweaver-Burk プロット。コントロール(\square)、100 μM プラミペキソール(\blacktriangle)、500 μM プラミペキソール(\circ)。E: Lineweaver-Burk プロットの再プロット。

考察

パーキンソン病におけるドパミンニューロン変性は発症後も慢性的に進行するため、症状もまた次第に重篤になり、患者のQOLを著しく低下させ最終的には日常生活に介護が必要な状態になる。したがって、ドパミンニューロン死の進行を抑制することは臨床的にも重要であり、プラミペキソールの神経保護作用の可能性には期待が寄せられている。

本章において、進行期のパーキンソン病におけるドパミンニューロン死への関与が考えられるグルタミン酸神経毒性に対するプラミペキソールの保護作用について検討した。中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対しプラミペキソールは保護作用を示したが、100 μM 以上の濃度が必要であった。プラミペキソールのドパミン D_{25} 受容体への親和性を示す K_i 値が数nMであることを考えると、受容体アゴニストとしての作用以外の関与が推定される。実際、ドパミン D_2 受容体アンタゴニストであるドンペリドンにより保護作用が抑制されなかったことや、受容体への親和性が弱い光学異性体が同程度の保護作用を発現したことから、プラミペキソールの保護作用にドパミン D_{25} 受容体刺激が関与しないことが裏付けられる。

*In vivo*および*in vitro*のパーキンソン病モデルにおいて、ドパミン D_2 タイプアゴニストの神経保護作用を示唆する報告は多いが、その多くは抗酸化作用や抗アポトーシス作用によるものである[149]。第一章の述べたように、本実験条件におけるグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死には酸化ストレスやアポトーシスの関与を示唆する結果は得られなかった。そのため、グルタミン酸神経毒性に対するプラミペキソールの保護作用には新たな機序が想定される。第一章において、グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に内在性ドパミンが関与することを示した。そこで、内在性ドパミンに対する作用を検討したところ、プラミペキソールはドパミン含有量を濃度依存的に顕著に減少させた。したがって、このプラミペキソールによるドパミン含有量の低下が、保護作用機序の一つとして示唆される。 $\alpha\text{-MT}$ (100 μM)はドパミン含有量を $51.4 \pm 8.3\%$ まで減少させたが(図1-29A)、グルタミン酸に対する保護作用にはそれ以上のドパミン含有量低下が必要であった(図1-30A)。このことは、グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死を抑制するためには少なくともドパミン含有量を50%以下まで低下させる必要があることを示している。実際、プラミペキソール(10 μM)も有意にドパミン含有量を $56.9 \pm 1.5\%$ まで低下させたが保護作用は示さず、 $30.4 \pm 1.0\%$ まで低下させた100 μM のプラミペキソールが保護作用の発現に必要であった本章の結果と一致する。さらに、プラミペキソールによるドパミン含有量の低下が可逆的であったことは、最も効果的な保護作用に前処置および同時処置の両方が必要であったことと矛盾しない。以上をまとめると、プラミペキソールによるドパミン含有量の低下がグルタミン酸神経毒性に対する保護作用に寄与することが示唆された。

プラミペキソールを4日間経口投与したラットにおいて、脳内プラミペキソールの濃度は数 μM に達する。さらに、プラミペキソールの脳内濃度は血漿中濃度より高く、脳へ約6倍蓄積しやすいことが報告されている[150]。ただし、臨床投与量のプラミペキソールでは、脳内濃度が本実験条件下で保護作用を示した100 μM の濃度に達することは考えにくい。したがって、臨床において示唆されるプラミペキソールの神経保護作用には、別の機序も考えられる。図3-6で示したように、プラミペキソールはロイコアミノクローム α -セミキノラジカル除去能を有することを明らかにした。10 mMのドパミンから生成したロイコアミノクローム α -セミキノラジカルを除去するために、10 mMのプラミペキソールが必要であった。これは化学量論的には等量であり、プラミペキソールのラジカル除去能が強力であることを示している。したがって、プラミペキソールによるこのラジカル除去能もまた、ドパミン含有量低下作用に加えて、グルタミン酸神経毒性に対する保護作用に寄与することが示唆される。

中脳初代培養細胞において、ドンペリドンはプラミペキソールによるドパミン含有量の低下を抑制しなかった。また、受容体への親和性の弱い光学異性体がドパミン含有量を同程度低下させたことから、プラミペキソールによるドパミン含有量の低下にはドパミン D_2 受容体刺激を必要としないことが示唆される。しかし、ドパミン D_2 受容体アゴニストであるプロモクリプチンおよび7-OH-DPATもまた、ドパミン含有量を低下させグルタミン酸神経毒性を抑制した。特に、プロモクリプチンは麦角系のドパミン D_2 受容体アゴニストでプラミペキソールとはその分子構造が大きく異なる。それにも関わ

らず、これらのドパミンD₂受容体アゴニストがドパミンD₂受容体刺激以外の共通の機序によりグルタミン酸神経毒性を抑制したことは興味深い。

中脳初代培養細胞におけるドパミンニューロンの割合は2-3%に過ぎず、総タンパク量あたりのドパミン含有量が少ないため、プラミペキソールによるドパミン含有量低下の詳細な機序はドパミン含有株化細胞であるPC12細胞を用いて検討する方が妥当であった。PC12細胞でも中脳初代培養細胞と同様に、プラミペキソールによるドパミン含有量の低下が認められた。全てではないが、多くのドパミンアゴニスト/アンタゴニストによってもドパミン含有量は低下し、その作用はドパミン受容体への作用と関連したものではなかった。さらに、S(-)-プラミペキソールによるドパミン含有量低下作用は、R(+)-体に比べ弱く、ドパミンD₂受容体アンタゴニストであるスルピリドによっても抑制されなかった。これらの結果からもドパミンアゴニスト/アンタゴニストによるドパミン含有量低下作用はドパミン受容体刺激を必要としないことが確認された。検討したドパミンアゴニスト/アンタゴニストのうちキンピロールだけがドパミン含有量を増加させた。これは、キンピロールがドパミンD₂受容体を介して小胞へのドパミン取込を亢進させることによるものかもしれない[151]。しかし、キンピロールは副腎ではドパミン含有量を増加させたが、前脳では影響を及ぼさなかったため、Kujacicらは末梢組織特有の作用であると指摘している[152]。また他のドパミンD₂受容体アゴニストも同様の作用を有すると考えられるが、ドパミンD₂受容体を介さないドパミン含有量低下作用によりマスクされていることが推測される。

プラミペキソールはドパミンだけではなくノルアドレナリンの含有量も減少させた。したがって、ドパミンからノルアドレナリンへの変換に関わるドパミン-β-ヒドロキシラーゼ活性が増大し、ドパミン含有量が減少したとは考えられない。以前の報告では、ドパミンD₂受容体刺激によりTHのSer40における脱リン酸化が数分以内で起こることが示されている[153]。しかし、本研究では、プラミペキソールの24時間処置によりTHのリン酸化および総タンパク量に変化は無かった。過去の報告にあるようなドパミンD₂受容体刺激による一過性のTHの脱リン酸化では持続的なドパミン含有量の減少に寄与しないように思える。実際、TH活性を測定したところ、プラミペキソールにより低下したが、その程度はα-MTに比べ非常に小さいものだった。α-MTによるドパミン生合成の障害はドパミン代謝物も顕著に低下させたが、プラミペキソールによるドパミン代謝物の減少は限定的であった。このことから、細胞内ドパミンの枯渇がプラミペキソールによる僅かなTH活性の低下に起因するものではないことが示唆される。また、プラミペキソールはMAO活性には影響を与えず、ドパミン自動酸化はむしろ遅延させたので、ドパミン分解の亢進がプラミペキソールによるドパミン含有量低下作用の説明にはなり得ない。

プラミペキソールによるドパミン含有量の低下は、処置後30分以内起こる非常に急速な変化であり、その際、ドパミン遊離を伴うものであった。ドパミンの細胞外への遊離は処置直後には増加したが、処置後24時間での遊離量は増加しなかった。プラミペキソールによるドパミン含有量の低下はテトロドトキシンにより抑制されなかったため、脱分極による開口分泌が関与している可能性は低い[154]。開口分泌以外のドパミン遊離機構として、DATによる細胞内ドパミンの逆輸送が知られている[155]。この非定型的な遊離機構は、細胞質のドパミン濃度が上昇したときに起こる。ドパミン合成の亢進、MAO活性の低下および細胞内貯蔵プールからのドパミン置換が起こった場合、細胞質のドパミン濃度は上昇する[155]。すでに述べたように、前者2つの可能性は排除できる。細胞内ドパミンは主にVMATにより分泌小胞に蓄えられ、その濃度は500 μMにまで達する[156]。実際、レセルピンはVMATを阻害し、一過性の遊離を介して細胞内ドパミンを枯渇させることが報告されている[145]。それゆえ、プラミペキソールによるドパミン含有量の低下の最も可能性の高い機序として、VMATの阻害作用が考えられる。プラミペキソールはドパミンの小胞内取込を濃度依存的に顕著に抑制した。ドパミン含有量低下作用を示したドパミンアゴニスト/アンタゴニストもまた小胞内取込を阻害し、ドパミン含有量低下作用が無かったキンピロールとスルピリドは小胞取込に有意な影響を与えなかった。その上、小胞内取込阻害作用の程度はドパミン含有量低下の程度に類似していた。以上の結果から、多くのドパミンアゴニスト/アンタゴニストによるドパミン含有量低下作用はドパミンの小胞内取込抑制作用によるものであることが示唆される。

プラミペキソールを処置した細胞では、細胞内にプラミペキソールが濃度依存的に検出された。プラミペキソールは分子内にアミノ基を有する塩基性薬物で、有機カチオン輸送体の基質になることが報告されている[157]。神経細胞や副腎に有機カチオン輸送体が発現していることから[158,159]、プラミペキソールの細胞内への取込機構が存在することが示唆される。速度論的な解析より、プラミペキソールはドパミンの小胞内取込を競合的に阻害した。したがって、細胞内に取り込まれたプラミペキソールがVMATのモノアミン認識部位に直接結合していることが考えられる。レセルピンもまたVMATのモノアミン認識部位に結合するが、その結合は不可逆的である[160]。一方、プラミペキソールを含む多くのドパミンアゴニスト/アンタゴニストによるドパミン含有量の低下は可逆的であったことから、モノアミン認識部位に結合しドパミンの代わりに小胞内に輸送されていることが推測される。VMATは本来の基質である生体アミンに加え、MPP⁺やアンフェタミンの誘導体など様々な薬物を輸送することが知られている[161,162]。輸送される化合物は芳香環と正電荷を有するため、Schuldinerは、これら共通の構造的特徴がVMATの基質認識に関与するため、基質特異性が低いのではないかと推定している[160]。ほとんど全てのドパミンアゴニスト/アンタゴニストは、分子内にドパミン分子の基本構造を含むため、芳香環の近傍に塩基性アミンが存在する。さらに、PC12細胞においてはプラミペキソールの光学異性体で作用強度の違いがあったことから、芳香環と塩基性アミンの空間配置がVMATの基質認識に重要であると思われる。しかし、芳香環と塩基性アミンを含有するキンピロールやスルピリドは小胞内ドパミン取込を抑制しなかった。セロトニン受容体アンタゴニストであるケタンセリンはVMATに結合し阻害作用を示すが、その誘導体のVMATへの親和性は多様であった[163]。これらのことを考慮すると、芳香環と塩基性アミン以外の分子構造もVMATの基質認識に寄与していることが示唆される。

VMATには構造的に類似するが、薬理学的に異なる2つのアイソフォームが存在する。VMAT1はPC12細胞よりクローニングされ、末梢組織にのみ存在し脳には発現しない[161]。中枢においては、ラット脳よりクローニングされたVMAT2が機能する[164]。VMAT2はVMAT1に比べ、モノアミン、特にヒスタミンに対する親和性が高い[165,166]。レセルピンおよびケタンセリンはVMAT1よりVMAT2に対する阻害作用が強く、テトラベナジンはVMAT1のみ阻害する[166]。このようにアイソフォームの違いにより基質親和性が異なるため、一部のドパミンアゴニスト/アンタゴニストのドパミン含有量低下作用に中脳初代培養細胞とPC12細胞で異なる結果が得られたことも妥当である。

結論として、パーキンソン病治療薬であるプラミペキソールはグルタミン酸神経毒性を抑制し、その機序として、小胞内ドパミン取込阻害によるドパミン含有量の低下およびドパミン酸化中間体ラジカルの除去が示唆された(図3-17)。プラミペキソールはドパミンアゴニストであることから、シナプス伝達は保ったまま、ドパミン含有量低下作用により細胞内での異常なドパミン酸化を抑制することができる。本章の研究結果は、ドパミンアゴニストによる神経変性抑制作用に新たな機序を提案するものである。

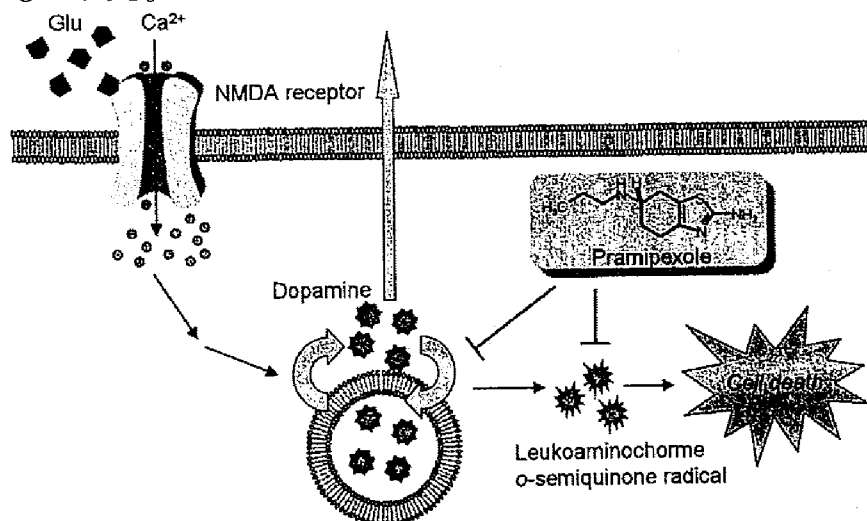


図 3-17 プラミペキソールのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用機序

総括および結論

本研究において、著者は、ドパミンニューロンの脆弱性に関わる因子として内在性ドパミンの役割およびパーキンソン病治療薬プラミペキソールの神経保護作用機序について研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

- (1) 中脳初代培養細胞において、ロテノンによりミトコンドリア複合体 I を部分的に長期間阻害すると、ドパミンニューロン選択的に細胞死が惹起されることを見出した。ロテノン毒性はスーパーオキシドの除去または細胞内ドパミンの枯渇により抑制されたことから、複合体 I 阻害により発生したスーパーオキシドがドパミン酸化を促進し細胞毒性を発現することが示唆された。

パラコートはアルデヒド脱水素酵素の活性を抑制し、PC12細胞のドパミン含有量を上昇させた。細胞内ドパミン枯渇下においてPC12細胞はパラコート毒性に対し抵抗性を示したことから、過剰に蓄積したドパミンにより細胞死が誘発されることが示唆された。

中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対し、ドパミンニューロンは非ドパミンニューロンに比べ脆弱であった。グルタミン酸曝露によりTHのリン酸化およびドパミン遊離が増加した。グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死もまた細胞内ドパミンを枯渇させることで抑制されたことから、グルタミン酸に対する脆弱性に内在性ドパミンの動態の変化が寄与することが示唆された。

以上の結果より、ロテノン、パラコートおよびグルタミン酸がドパミンニューロンに対して強い細胞毒性を発現する因子として内在性ドパミンが重要な役割を果たすと結論された。

- (2) SH-SY5Y 細胞におけるドパミン誘発細胞死は抗チオール酸化薬グルタチオンによりほぼ完全に抑制されたが、過酸化水素除去酵素カタラーゼによる保護作用は限定的であった。ドパミン酸化中間体の生成はグルタチオンにより抑制されたものの、カタラーゼにより影響を受けなかった。さらに、鉄イオンによりドパミン酸化中間体から最終生成物であるメラニンへの変換を促進させドパミン酸化中間体を減少させると、ドパミン毒性は抑制された。これらの結果より、ドパミンの毒性発現には酸化過程で生成する過酸化水素よりもむしろ酸化中間体が中心的な役割を果たしていることが示された。

- (3) 中脳初代培養細胞において、グルタミン酸神経毒性に対しドパミン D₂ 受容体アゴニストであるプラミペキソールは 100 μ M 以上の濃度においてドパミンニューロンを保護した。この保護作用は D₂ タイプアンタゴニストのドンペリドンにより抑制されなかった。プラミペキソールはドパミン含有量を顕著に低下させたが、ドンペリドンにより減弱されなかった。ドパミン含有量低下の機序を検討したところ、プラミペキソールはドパミンの小胞内取込を競合的に阻害することを見出した。したがって、プラミペキソールは小胞内ドパミン取込阻害によりドパミン含有量を低下させることで、グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対し保護作用を発現することが示唆された。

以上、著者は、種々の神経毒に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが関与し、その毒性にはドパミン酸化中間体が重要な役割を果たすことを示した。さらに、プラミペキソールの神経保護作用に関する新たな機序を見出した。本研究の成果は、パーキンソン病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新しい治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただき、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 赤池 昭紀 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益なご助言をいただきました宇多野病院・関西脳神経筋センター 澤田 秀幸 臨床研究部長、並びに京都大学大学院薬学研究科 香月 博志 助教授、久米 利明 助手に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言をいただきました札幌医科大学付属病院 下濱 俊 教授、並びに、京都大学大学院薬学研究科 杉本 八郎 教授、金子 周司 教授、新留 徹広 助教授、中川 貴之 助教授、木原 武士 講師、白川 久志 助手に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、S(-)およびR(+)-プラミペキソールを提供していただきましたペーリンガーインゲルハイム株式会社に感謝いたします。

さらに、研究生活を始めるにあたり、直接御指導を賜り多くの御助言をいただきました小野薬品工業株式会社 作花 範子 修士に心から感謝の意を表すると共に、本研究にご協力いただきました京都大学大学院薬学研究科 山本 憲幸 修士、並びに、京都大学大学院医学研究科 山川 健太郎 氏、竹内 啓喜 氏に深く感謝いたします。

また日々の研究生活に専念するにあたり互いに協力し合えた、小坂田 文隆 修士、藤本 真二 修士をはじめ薬品作用解析学分野、創薬神経科学講座、並びに、生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり、研究に専心できるように支えてくださった父 栄二、母 真佐子に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究の一部は、以下の論文に公表した。

1. Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone
Sakka Noriko, Sawada Hideyuki, Izumi Yasuhiko, Kume Toshiaki, Katsuki Hiroshi, Kaneko Shuji, Shimohama Shun, Akaike Akinori.
Neuroreport. (2003) **14**:2425-2428.
2. *p*-Quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of *p*-quinone into melanin extracellularly.
Izumi Yasuhiko, Sawada Hideyuki, Sakka Noriko, Yamamoto Noriyuki, Kume Toshiaki, Katsuki Hiroshi, Shimohama Shun, Akaike Akinori.
Journal of Neuroscience Research. (2005) **79**:849-860.
3. Iron accelerates the conversion of dopamine-oxidized intermediates into melanin and provides protection in SH-SY5Y cells.
Izumi Yasuhiko, Sawada Hideyuki, Yamamoto Noriyuki, Kume Toshiaki, Katsuki Hiroshi, Shimohama Shun, Akaike Akinori.
Journal of Neuroscience Research. (2005) **82**:126-137.
4. Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity.
Izumi Yasuhiko, Sawada Hideyuki, Yamamoto Noriyuki, Kume Toshiaki, Katsuki Hiroshi, Shimohama Shun, Akaike Akinori.
European Journal of Pharmacology. (2007) **557**:132-140.

引用文献

1. Ehringer H, Hornykiewicz O. (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr.* **38**:1236-1239.
2. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**:979-980.
3. Ramsay RR, Krueger MJ, Youngster SK, Gluck MR, Casida JE, Singer TP. (1991) Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *J Neurochem.* **56**:1184-1190.
4. Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. (2005) Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* **88**:193-201.
5. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet.* **1**:1269.
6. Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T. (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **44**:S99-109.
7. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* **3**:1301-1306.
8. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology.* **48**:1583-1588.
9. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* **10**:119-127.
10. Stephans SE, Miller GW, Levey AI, Greenamyre JT. (2002) Acute mitochondrial and chronic toxicological effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium in human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology.* **23**:569-580.
11. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* **12**:73-94.
12. Chatha BT, Bernard V, Streit P, Bolam JP. (2000) Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience.* **101**:1037-1051.
13. Groenewegen HJ, Berendse HW. (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol.* **294**:607-622.
14. Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW. (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol.* **44**:S175-188.
15. Orimo S, Ozawa E, Nakade S, Sugimoto T, Mizusawa H. (1999) ¹²³I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **67**:189-194.
16. Sawada H, Yamakawa K, Yamakado H, Hosokawa R, Ohba M, Miyamoto K, Kawamura T, Shimohama S. (2005) Cocaine and phenylephrine eye drop test for Parkinson disease. *JAMA.* **293**:932-934.
17. Rosenberg PA. (1988) Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci.* **8**:2887-2894.
18. Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR. (1998) Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther.* **284**:215-221.
19. Wierzbowski J, Wroczynski P, Laszuk K, Interwicz E. (1997) Fluorimetric detection of aldehyde dehydrogenase activity in human blood, saliva, and organ biopsies and kinetic differentiation between class I and class III isozymes. *Anal Biochem.* **245**:69-78.
20. Davey GP, Peuchen S, Clark JB. (1998) Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem.* **273**:12753-12757.
21. Barrientos A, Moraes CT. (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem.* **274**:16188-16197.

22. Faulkner KM, Liochev SI, Fridovich I. (1994) Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *J Biol Chem.* 269:23471-23476.
23. Jalava A, Akerman K, Heikkilä J. (1993) Protein kinase inhibitor, staurosporine, induces a mature neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells through an alpha-, beta-, and zeta-protein kinase C-independent pathway. *J Cell Physiol.* 155:301-312.
24. Peng J, Stevenson FF, Doctrow SR, Andersen JK. (2005) Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease. *J Biol Chem.* 280:29194-29198.
25. Kumer SC, Vrana KE. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem.* 67:443-462.
26. Hafer G, Agarwal DP, Goedde HW. (1987) Human brain aldehyde dehydrogenase: activity with DOPAL and isozyme distribution. *Alcohol.* 4:413-418.
27. Choi DW. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1:623-634.
28. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron.* 2:1547-1558.
29. Sattler R, Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 78:3-13.
30. Yu SP. (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol.* 70:363-386.
31. Zhao YM, Sun LN, Zhou HY, Wang XL. (2006) Voltage-dependent potassium channels are involved in glutamate-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 398:22-27.
32. Haddad JJ. (2005) N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol.* 77:252-282.
33. Schwarzschild MA, Cole RL, Meyers MA, Hyman SE. (1999) Contrasting calcium dependencies of SAPK and ERK activations by glutamate in cultured striatal neurons. *J Neurochem.* 72:2248-2255.
34. Ko HW, Park KY, Kim H, Han PL, Kim YU, Gwag BJ, Choi EJ. (1998) Ca²⁺-mediated activation of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa B by NMDA in cortical cell cultures. *J Neurochem.* 71:1390-1395.
35. Ferrer I, Blanco R, Carmona M. (2001) Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 94:48-58.
36. Cao J, Semenova MM, Solovyan VT, Han J, Coffey ET, Courtney MJ. (2004) Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J Biol Chem.* 279:35903-35913.
37. Lindgren N, Xu ZQ, Lindskog M, Herrera-Marschitz M, Gojny M, Haycock J, Goldstein M, Hokfelt T, Fisone G. (2000) Regulation of tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser(19) and Ser(40) via activation of glutamate NMDA receptors in rat striatum. *J Neurochem.* 74:2470-2477.
38. Whitton PS. (1997) Glutamatergic control over brain dopamine release in vivo and in vitro. *Neurosci Biobehav Rev.* 21:481-488.
39. Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. (2002) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 22:782-790.
40. Gao HM, Liu B, Hong JS. (2003) Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 23:6181-6187.
41. Zhang P, Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Ceballos-Picot I, Sinet PM, Nicole A, Laurent M, Javoy-Agid F. (1993) Preferential expression of superoxide dismutase messenger RNA in melanized neurons in human mesencephalon. *Neuroscience.* 55:167-175.
42. Nakamura K, Wang W, Kang UJ. (1997) The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J Neurochem.* 69:1850-1858.
43. Olanow CW. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16:439-444.
44. LaVoie MJ, Hastings TG. (1999) Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal

- neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci.* 19:1484-1491.
45. Cavalieri EL, Li KM, Balu N, Saced M, Devanecan P, Higginbotham S, Zhao J, Gross ML, Rogan EG (2002) Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis.* 23:1071-1077.
 46. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 294:1346-1349.
 47. Stoltenberg-Diding G (1994) Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. *Neurotoxicology.* 15:445-450.
 48. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. (2000) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20:9207-9214.
 49. Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA. (2003) Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci.* 18:589-600.
 50. Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, Labus L, Kwiecinski A, Krygowska-Wajs A, Wolfarth S. (2005) Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacol Rep.* 57:330-335.
 51. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. (2003) Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res.* 976:243-252.
 52. Lam JP, Mays DC, Lipsky JJ. (1997) Inhibition of recombinant human mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases by two candidates for the active metabolites of disulfiram. *Biochemistry.* 36:13748-13754.
 53. Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J, Nechustan A, Kirk K, Kopin IJ. (2000) 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects of metabolic stress in PC12 cells. *Brain Res.* 868:191-201.
 54. Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jain JC, Ulluci PA, Li SW, Burke WJ. (2001) Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 30:924-931.
 55. Legros H, Dingeval MG, Janin F, Costentin J, Bonnet JJ. (2004) Toxicity of a treatment associating dopamine and disulfiram for catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells: relationships with 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde formation. *Neurotoxicology.* 25:365-375.
 56. Kawamura M, Kopin IJ, Kador PF, Sato S, Tjurmina O, Eisenhofer G (1997) Effects of aldehyde/aldehyde reductase inhibition on neuronal metabolism of norepinephrine. *J Auton Nerv Syst.* 66:145-148.
 57. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. (2001) Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 906:135-142.
 58. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. (2003) Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res.* 976:243-252.
 59. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Shiono H. (2003) Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci Res.* 46:523-532.
 60. Barlow BK, Thiruchelvam MJ, Bennice L, Cory-Slechta DA, Ballatori N, Richfield EK. (2003) Increased synaptosomal dopamine content and brain concentration of paraquat produced by selective dithiocarbamates. *J Neurochem.* 85:1075-1086.
 61. Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. (2005) Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 134:52-56.
 62. Kikuchi S, Kim SU. (1993) Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res.* 36:558-569.
 63. Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, Akaike A, Kimura J. (1996) Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J Neurosci Res.* 43:503-510.
 64. Urushitani M, Shimohama S, Kihara T, Sawada H, Akaike A, Ibi M, Inoue R, Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura J. (1994) Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann Neurol.* 44:796-807.

65. Takada Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, Akaike A. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **306**:772-777.
66. Ciani E, Groneng L, Voltattorni M, Rolseth V, Contestabile A, Paulsen RE. (1996) Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **728**:1-6.
67. Yuan J, Lipinski M, Degterev A. (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron.* **40**:401-413.
68. Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. (2004) Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants—facts and hypotheses. *J Cell Mol Med.* **8**:45-58.
69. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jing G. (2000) N-methyl-D-aspartate receptor activation results in regulation of extracellular signal-regulated kinases by protein kinases and phosphatases in glutamate-induced neuronal apoptotic-like death. *Brain Res.* **887**:285-292.
70. Crisanti P, Leon A, Lim DM, Omri B. (2005) Aspirin prevention of NMDA-induced neuronal death by direct protein kinase Czeta inhibition. *J Neurochem.* **93**:1587-1593.
71. Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science.* **278**:114-117.
72. Hughes FM Jr, Cidowski JA. (1999) Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv Enzyme Regul.* **39**:157-171.
73. Xuan Chi X, Xu ZC. (2000) Potassium currents in CA1 neurons of rat hippocampus increase shortly after transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* **281**:5-8.
74. Huang H, Gao TM, Gong L, Zhuang Z, Li X. (2001) Potassium channel blocker TEA prevents CA1 hippocampal injury following transient forebrain ischemia in adult rats. *Neurosci Lett.* **305**:83-86.
75. Wei L, Yu SP, Gottron F, Snider BJ, Zipfel GJ, Choi DW. (2003) Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke.* **34**:1281-1286.
76. Lei M, Brown HF. (1998) Inhibition by Compound II, a sotalol analogue, of delayed rectifier current (iK) in rabbit isolated sino-atrial node cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **357**:260-267.
77. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. (1999) Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res.* **85**:623-633.
78. Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS. (2004) Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci.* **7**:711-718.
79. Pal S, Hartnett KA, Nerbonne JM, Levitan ES, Aizenman E. (2003) Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J Neurosci.* **23**:4798-4802.
80. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina J. (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron.* **40**:775-784.
81. Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem.* **91**:1025-1043.
82. Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF. (1992) Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem.* **267**:12639-12646.
83. Bobrovskaya L, Dunkley PR, Dickson PW. (2004) Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. *J Neurochem.* **90**:857-864.
84. Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, Krebs EG. (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:2365-2369.
85. Sutherland C, Alterio J, Campbell DG, Le Bourdelles B, Mallet J, Haavik J, Cohen P. (1993) Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and

86. Halloran SM, Vulliamt PR. (1994) Microtubule-associated protein kinase-2 phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase following depolarization of bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* 269:30960-30965.
87. Mount H, Quirion R, Chaudieu I, Boksa P. (1990) Stimulation of dopamine release from cultured rat mesencephalic cells by naturally occurring excitatory amino acids: involvement of both N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor subtypes. *J Neurochem.* 55:268-275.
88. Hu G, Duffy P, Swanson C, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW. (1999) The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:412-416.
89. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 52:381-389.
90. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 69:1196-1203.
91. Floor E, Wetzel MG. (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 70:268-275.
92. Jenner P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13:24-34.
93. Jenner P, Olanow C W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 47:S161-S170.
94. Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature.* 334:345-348.
95. Smythies J, Galzigna L. (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta.* 10:59-62.
96. Hastings TG, Lewis DA, Zigmund MJ. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1956-1961.
97. Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem.* 56:978-982.
98. Double KL, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. (2000) Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 60:37-58.
99. Oestreicher E, Sengstock GJ, Riederer P, Olanow CW, Dunn AJ, Arendash GW. (1994) Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Res.* 660:8-18.
100. Youdim MB, Riederer P. (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 40:57-67.
101. Bandy B, Walter PB, Moon J, Davison AJ. (2001) Reaction of oxygen with 6-hydroxydopamine catalyzed by Cu, Fe, Mn, and V complexes: identification of a thermodynamic window for effective metal catalysis. *Arch Biochem Biophys.* 389:22-30.
102. Weingarten P, Bermak J, Zhou QY. (2001) Evidence for non-oxidative dopamine cytotoxicity: potent activation of NF-kappa B and lack of protection by anti-oxidants. *J Neurochem.* 76:1794-1804.
103. Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N. (2003) Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1619:39-52.
104. Dagnino-Subiabre A, Cassels BK, Baez S, Johansson AS, Mannervik B, Segura-Aguilar J. (2000) Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o-quinones. *Biochem Biophys Res Commun.* 21:32-36.
105. Nappi AJ, Vass E. (2001) The effects of Nitric Oxide on the Oxidations of L-Dopa and Dopamine Mediated by Tyrosinase and Peroxidase. *J Biol Chem.* 276:11214-11222.
106. Segura-Aguilar J, Baez S, Widersten M, Welch CJ, Mannervik B. (1997) Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *J Biol Chem.* 272:5727-5731.
107. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res.* 55:659-665.
108. Hastings TG, Lewis DA, Zigmund MJ. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections.

Proc Natl Acad Sci U S A. **93**:1956-1961.

109. Kuhn DM, Arthur RE Jr, Thomas DM, Elferink LA. (1999) Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* **73**:1309-1317.
110. Whitehead RE, Ferrer JV, Javitch JA, Justice JB. (2001) Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem.* **76**:1242-1251.
111. Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y. (1995) Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem.* **64**:718-723.
112. Berman SB, Hastings TG. (1999) Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* **73**:1127-1137.
113. Arriagada C, Paris I, Sanchez de las Matas MJ, Martinez-Alvarado P, Cardenas S, Castaneda P, Graumann R, Perez-Pastene C, Olea-Azar C, Couve E, Herrero MT, Caviedes P, Segura-Aguilar J. (2004) On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiol Dis.* **16**:468-477.
114. Diaz-Veliz G, Mora S, Dossi MT, Gomez P, Arriagada C, Montiel J, Aboitiz F, Segura-Aguilar J. (2002) Behavioral effects of aminochrome and dopachrome injected in the rat substantia nigra. *Pharmacol Biochem Behav.* **73**:843-850.
115. De Iuliis A, Burlina AP, Boschetto R, Zambenedetti P, Arslan P, Galzigna L. (2002) Increased dopamine peroxidation in postmortem Parkinsonian brain. *Biochim Biophys Acta.* **1573**:63-67.
116. Graumann R, Paris I, Martinez-Alvarado P, Rumanque P, Perez-Pastene C, Cardenas SP, Marin P, Diaz-Grez F, Caviedes R, Caviedes P, Segura-Aguilar J. (2002) Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Pol J Pharmacol.* **54**:573-579.
117. Segura-Aguilar J, Metodiowa D, Welch CJ. (1998) Metabolic activation of dopamine o-quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim. Biophys. Acta.* **1381**:1-6.
118. Arriagada C, Paris I, Sanchez de las Matas MJ, Martinez-Alvarado P, Cardenas S, Castaneda P, Graumann R, Perez-Pastene C, Olea-Azar C, Couve E, Herrero MT, Caviedes P, Segura-Aguilar J. (2004) On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiol Dis.* **16**:468-477.
119. Double KL, Maywald M, Schmitt M, Riederer P, Gerlach M. (1998) In vitro studies of ferritin iron release and neurotoxicity. *J Neurochem.* **70**:2492-2499.
120. Heikkila RE, Cabbat FS. (1981) Inhibition of iron-stimulated catecholamine degradation by the iron-chelators DETAPAC and Desferal. Potentially useful laboratory agents. *Biochem Pharmacol.* **30**:2945-2947.
121. Welch KD, Davis TZ, Aust SD. (2002) Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys.* **397**:360-369.
122. Velez-Pardo C, Jimenez Del Rio M, Verschuere H, Ebinger G, Vauquelin G. (1997) Dopamine and iron induce apoptosis in PC12 cells. *Pharmacol Toxicol.* **80**:76-84.
123. Migheli R, Godani C, Sciola L, Delogu MR, Serra PA, Zangani D, De Natale G, Miele E, Desole MS. 1999. Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J Neurochem* **73**:1155-1163.
124. Paris I, Dagnino-Subiabre A, Marcelain K, Bennett LB, Caviedes P, Caviedes R, Azar CO, Segura-Aguilar J. (2001) Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J Neurochem.* **77**:519-529.
125. Carter AJ, Muller RE. (1991) Pramipexole, a dopamine D2 autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. *Eur J Pharmacol.* **200**:65-72.
126. Carvey PM, Pieri S, Ling ZD. (1997) Attenuation of levodopa-induced effects are more common than in monotherapy trials, toxicity in mesencephalic cultures by pramipexole. *J Neural Transm.* **104**:209-228.
127. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. (1998) Protective effects of the

- antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*. **54**:1046-1054.
128. Abramova NA, Cassarino DS, Khan SM, Painter TW, Bennett JP Jr. (2002) Inhibition by R(+) or S(-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. *J Neurosci Res*. **67**:494-500.
 129. Gu M, Iravani MM, Cooper JM, King D, Jenner P, Schapira AH. (2004) Pramipexole protects against apoptotic cell death by non-dopaminergic mechanisms. *J Neurochem*. **91**:1075-1081.
 130. Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH. (2000) Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm*. **107**:1165-1173.
 131. Ferger B, Teismann P, Mierau J. (2000) The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*. **883**:216-223.
 132. Parkinson Study Group. (2002) Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA*. **287**:1653-1661.
 133. Whone AL, Remy P, Davis MR. (2002) The REAL-PET study: slower progression in early Parkinson's disease treated with ropinirole compared with L-dopa. *Neurology*. **58**:82-83.
 134. Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Althaus JS, VonVoigtlander PF. (1996) Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res*. **742**:80-88.
 135. Congar P, Bergevin A, Trudeau LE. (2002) D₂ receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol*. **87**:1046-1056.
 136. Webb CK, McCudden CR, Willard FS, Kimple RJ, Siderovski DP, Oxford GS. (2005) D₂ dopamine receptor activation of potassium channels is selectively decoupled by G α -specific GoLoco motif peptides. *J Neurochem*. **92**:1408-1418.
 137. Piercey MF, Hoffmann WE, Smith MW, Hyslop DK. (1996) Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D₃ receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur J Pharmacol*. **312**:35-44.
 138. Kraxner J, Hubner H, Gmeiner P. (2000) Azepino- and diazepinoindoles: synthesis and dopamine receptor binding profiles. *Arch Pharm*. **333**:287-292.
 139. Schneider CS, Mierau J. (1987) Dopamine autoreceptor agonists: resolution and pharmacological activity of 2,6-diaminotetrahydrobenzothiazole and an aminothiazole analogue of apomorphine. *J Med Chem*. **30**:494-498.
 140. Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D. (1998) D₂-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci*. **18**:5575-5585.
 141. Chu E, Chu J, Socci RR, Chu TC. (2004) 7-OH-DPAT-induced inhibition of norepinephrine release in PC12 cells. *Pharmacology*. **70**:130-139.
 142. Seegal RF, Brosch K, Bush B, Ritz M, Shain W. (1989) Effects of Aroclor 1254 on dopamine and norepinephrine concentrations in pheochromocytoma (PC-12) cells. *Neurotoxicology*. **10**:757-764.
 143. Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. (2001) Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med*. **31**:1473-1485.
 144. Shafer TJ, Atchison WD. (1991) Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology*. **12**:473-492.
 145. Mahata M, Mahata SK, Parmer RJ, O'Connor DT. (1996) Vesicular monoamine transport inhibitors. Novel action at calcium channels to prevent catecholamine secretion. *Hypertension*. **28**:414-420.
 146. Dixon M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*. **55**:170-171.
 147. Khalid A, Zaheer-ul-Haq, Anjum S, Khan MR, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. (2004) Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. *Bioorg Med Chem*. **12**:1995-2003.
 148. Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. (1999) Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metab Dispos*. **27**:756-762.
 149. Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S, Akaike A, Nomura Y. (2003) Neuroprotective mechanisms of antiparkinsonian dopamine D₂-receptor subfamily agonists. *Neurochem Res*. **28**:1035-1040.

150. Danzeisen R, Schwalenstoecker B, Gillardon F, Buerger E, Krzykalla V, Klinder K, Schild L, Hengerer B, Ludolph AC, Dorner-Ciossek C, Kussmaul L. (2006) Targeted antioxidative and neuroprotective properties of the dopamine agonist pramipexole and its nondopaminergic enantiomer SND919CL2x [(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-L-propylamino-benzothiazole dihydrochloride]. *J Pharmacol Exp Ther*. **316**:189-199.
151. Truong JG, Newman AH, Hanson GR, Fleckenstein AE. (2004) Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *Eur J Pharmacol*. **504**:27-32.
152. Kujacic M, Svensson K, Lofberg L, Carlsson A. (1990) Acute changes in dopamine levels in rat adrenal glands after administration of dopamine receptor agonists and antagonists. *Eur J Pharmacol*. **177**:163-170.
153. Lindgren N, Xu ZQ, Herrera-Marschitz M, Haycock J, Hokfelt T, Fisone G (2001) Dopamine D(2) receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum. *Eur J Neurosci*. **13**:773-780.
154. Liao C, Nicholson RA. (2005) Depolarization-induced release of ethanolamine from brain synaptic preparations in vitro. *Brain Res*. **1060**:170-178.
155. Levie V. (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int*. **38**:83-106.
156. Phillips JH. (1982) Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience*. **7**:1595-1609.
157. Ishiguro N, Saito A, Yokoyama K, Morikawa M, Igarashi T, Tamai I. (2005) Transport of the dopamine D2 agonist pramipexole by rat organic cation transporters OCT1 and OCT2 in kidney. *Drug Metab Dispos*. **33**:495-499.
158. Busch AE, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, Arndt P, Ulzheimer JC, Sonders MS, Baumann C, Waldegger S, Lang F, Koepsell H (1998) Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol*. **54**:342-352.
159. Beery E, Middel P, Bahn A, Willenberg HS, Hagos Y, Koepsell H, Bornstein SR, Muller GA, Burckhardt G, Steffgen J. (2003) Molecular evidence of organic ion transporters in the rat adrenal cortex with adrenocorticotropin-regulated zonal expression. *Endocrinology*. **144**:4519-4526.
160. Schuldiner S. (1994) A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem*. **62**:2067-2078.
161. Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH (1992) A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*. **70**:539-551.
162. Schuldiner S, Steiner-Mordoch S, Yelin R, Wall SC, Rudnick G (1993) Amphetamine derivatives interact with both plasma membrane and secretory vesicle biogenic amine transporters. *Mol Pharmacol*. **44**:1227-1231.
163. Darchen F, Scherman D, Laduron PM, Henry JP (1988) Ketanserin binds to the monoamine transporter of chromaffin granules and of synaptic vesicles. *Mol Pharmacol*. **33**:672-677.
164. Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:10993-10997.
165. Peter D, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH (1994) The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem*. **269**:7231-7237.
166. Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:5166-5171.